

**НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ
імені ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО»**

Факультет біотехнології і біотехніки

Кафедра промислової біотехнології

До захисту допущено:

Завідувач кафедри

_____ Тетяна ТОДОСІЙЧУК

«___» _____ 2020 р.

Дипломний проєкт

на здобуття ступеня бакалавра

за освітньо-професійною програмою «Промислова біотехнологія»

спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»

на тему: «Технологія виробництва вітаміну А. Дільниця біосинтезу»

Виконала:

студентка IV курсу, групи БТ-62

Бездрабко Анастасія Дмитрівна _____

Керівник:

Проф.

Литвинов Г.С. _____

Консультант з Розділу 5. Розрахунок обладнання для проведення
технологічного процесу:

ст. викл. каф. біотехніки та інженерії

Фесенко С.В. _____

Рецензент:

проф..

Кузьмінський Є.В. _____

Засвідчую, що у цьому дипломному
проєкті немає запозичень з праць інших
авторів без відповідних посилань.

Студентка _____

Київ – 2020 року

ВІДОМІСТЬ ДИПЛОМНОГО ПРОЄКТУ

№ з/п	Формат	Позначення	Найменування	Кількість листів	Примітка
1	A4		Завдання на дипломний проєкт	2	
2	A4	ДП 6201. 00.000 ПЗ	Пояснювальна записка	128	
3	A1	ДП 6201. 01.000 ТК	Технологічна схема	1	
4	A1	ДП 6201. 02.000 ТК	Апаратурна схема	1	
5	A1	ДП 6201. 03.000 ТК	Ферментер	1	

				ДП 6201 00.000.00		
	ПБ	Підп.	Дата	Відомість дипломного проєкту	Лист	Листів
Розробн.	Бездрабко А.Д.				1	1
Керівн.	Литвинов Г.С.					
Консульт.	Фесенко С.В.					
Н/контр.						
Зав.каф.	Тодосійчук Т.С.				КПІ ім. Ігоря Сікорського Каф. ПБТ Гр. БТ-62	

Національний технічний університет України
«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»

Факультет біотехнології і біотехніки
Кафедра промислової біотехнології

Рівень вищої освіти – перший (бакалаврський)

Спеціальність – 162 «Біотехнології та біоінженерія»

Освітньо-професійна програма «Промислова біотехнологія»

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

_____ Тетяна ТОДОСІЙЧУК

«_27_» лютого 2020 р.

ЗАВДАННЯ

на дипломний проєкт студенту

Бездрабко Анастасії Дмитрівні

1. Тема проєкту «Технологія виробництва вітаміну А. Дільниця біосинтезу», керівник проєкту Литвинов Григорій Сергійович, проф., затверджені наказом по університету від «21» травня 2020 р. № 1125-с
2. Термін подання студентом проєкту _____
3. Вихідні дані до проєкту: штам-продуцент *Blakeslea trispora*; середовище культивування - Циглера; ферментер для промислового культивування - об'єм 6,3 м³; параметри культивування: $t = 28\text{ }^{\circ}\text{C}$, аерація, $\tau = 72\text{ год}$; спосіб очистки продукту – кристалізація; кінцевий продукт – кристалічний порошок у банках для харчової промисловості
4. Зміст пояснювальної записки: підібрати і охарактеризувати продуцент для виробництва вітаміну А; провести аналіз методів створення високопродуктивних промислових продуцентів, обґрунтувати схему отримання продуценту, що використовується у проєкті; визначити основні фізико-хімічні характеристики кінцевого продукту та біохімічні основи його

виробництва; скласти матеріальний баланс виробництва, розробити технологічну і апаратурну схему; обґрунтувати вибір конструкції ферментеру, здійснити технологічний, конструктивний та тепловий розрахунки.

5. Перелік графічного матеріалу (із зазначенням обов'язкових креслеників, плакатів, презентацій тощо): креслення загального виду ферментеру – 1 арк. А1, технологічна схема – 1 арк. А1, апаратурна схема – 1 арк. А1

6. Консультанти розділів проєкту

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
Розділ 5	Фесенко С.В., ст. викл. каф. біотехніки та інженерії		

7. Дата видачі завдання _____

Календарний план

№ з/п	Назва етапів виконання дипломного проєкту	Термін виконання етапів проєкту	Примітка
1.	Характеристика біологічного агента	30.03.20-07.04.20	
2.	Біохімічні основи виробництва	08.04.20-18.04.20	
3.	Методи отримання промислових продуцентів	19.04.20-30.04.20	
4.	Технологічна частина	01.05.20-10.05.20	
5.	Складання апаратурної схеми	11.05.20-18.05.20	
6.	Розрахунок обладнання для проведення технологічного процесу	19.05.20-28.05.20	
7.	Оформлення пояснювальної записки	29.05.20-06.06.20	

Студент

Анастасія БЕЗДРАБКО

Керівник

Григорій ЛИТВИНОВ

Пояснювальна записка
до дипломного проєкту
на тему: «Технологія виробництва вітаміну А. Дільниця біосинтезу»

Київ – 2020 року

РЕФЕРАТ

Дипломний проект: 128с., 11рис. , 4 табл., 103 посилання.

Робота присвячена вдосконаленню процесів біосинтезу, очищення готової продукції при виробництві вітаміну А (бета-каротину).

Запропоновано в якості продуцента бета-каротину використовувати 2 статеві форми штаму гетероталічного зігомідетного грибу *Blakeslea trispora* K2, отриманий в результаті селекції з використанням хімічного мутагенезу.

Розраховане та вибране ефективне та перспективне обладнання для біосинтезу каротину. Наведено технологічний, конструктивний та тепловий розрахунки ферментеру. В роботі обґрунтовані та подані технологічна та апаратурна схеми виробництва.

ГЕТЕРОТАЛІЧНИЙ ГРИБ, BLAKESLEA TRISPORA , ВІТАМІН А,
БЕТАКАРОТИН, ПОЖИВНЕ СЕРЕДОВИЩЕ, ГЛИБИННЕ
КУЛЬТИВУВАННЯ, СЕЛЕКЦІЯ, БІОСИНТЕЗ КАРОТИНУ,
ЕКСТРАГУВАННЯ, КРИСТАЛІЗАЦІЯ.

					ПБ.БТ6201.ДП			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат	РЕФЕРАТ	Стадія	Аркуш	Аркушів
Розробив	Бездрабко А.Д.							
Консульт.							5	122
	Литвинов Г.С.					КПІ ім. І. Сікорського ФБТ		

ABSTRACT

Degree project: 128 p., 11fig., 4 tab., 103 refs.

The work is devoted to improving the processes of biosynthesis, purification of finished product in the production of vitamin A (beta-carotene).

It is proposed to use as a producer of beta-carotene 2 sexual forms of the strain of heterothalic zygomycete fungus *Blakeslea trispora* K2, obtained by selection using chemical mutagenesis.

Calculated and selected effective and promising equipment for carotene biosynthesis. Technological, constructive and thermal calculations of the fermenter are given. The technological and apparatus schemes of production are substantiated and presented in the work.

HETEROTALIC FUNGI, BLAKESLEA TRISPORA, VITAMIN A, BETACAROTENE, NUTRITIONAL MEDIUM, DEEP CULTIVATION, SELECTION, CAROTENE BIOSYNTHESIS, EXTRACTION, CRYSTALLIZATION.

					ПБ.БТ6201.ДП			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат				
Розробив		Бездрабко А.Д.			ABSTRACT	Стадія	Аркуш	Аркушів
Консульт.							6	122
Керівник		Литвинов Г.С.				КПІ ім. І. Сікорського. ФБТ		

ЗМІСТ

ВСТУП.....	9
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА.....	11
1.1. Основні промислові продуценти.....	13
1.2. Систематичне положення.....	13
1.3. Морфолого-цитологічні ознаки.....	14
1.4. Культуральні ознаки.....	15
1.5. Фізіолого-біохімічні ознаки.....	15
РОЗДІЛ 2. БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ВИРОБНИЦТВА.....	21
2.1. Характеристика кінцевого продукту.....	21
2.2. Схема хімічних перетворень.....	24
2.3. Характеристика компонентного складу біотехнологічного препарату, отриманого в процесі реалізації технології.....	27
2.4. Методи очистки та виділення цільового продукту.....	28
2.5. Механізми впливу цільового продукту на біохімічні процеси.....	33
РОЗДІЛ 3. МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ПРОДУЦЕНТІВ.....	38
3.1 Генетична вивченість біологічного об'єкту.....	38
3.1.1 Наявність генетичних карт продуценту або типового представника групи.....	38
3.1.2 Вивченість механізмів експресії генів, відповідальних за синтез цільового продукту, індукторів та репресорів процесу синтезу.....	39
3.2. Загальні методи створення високопродуктивного промислового штаму.....	44
3.2.1. Використання природного та штучного добору.....	44
3.2.2. Використання індукованого мутагенезу.....	45
3.2.3. Використання гібридизації для створення промислових	

					ПБ.БТ6201.ДП			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат				
Розробив		Бездрабко А.Д.			ЗМІСТ	Стадія	Аркуш	Аркушів
Консульт.							7	122
Керівник		Литвинов				КПІ ім. І. Сікорського. ФБТ		

продуцентів біологічно-активних речовин.....	50
3.3. Схема отримання продуценту, що використовується в роботі....	54
3.4 Особливості технології або апаратурного оформлення у зв'язку з використанням обраного продуцента.	59
РОЗДІЛ 4. ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА.....	61
4.1 Характеристика кінцевої продукції виробництва.....	61
4.2. Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів, що використовуються у виробництві.....	63
4.3. Опис технологічного процесу.....	67
4.4. Матеріальний баланс.....	87
4.5. Контроль виробництва.....	90
РОЗДІЛ 5. РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ.....	95
5.1 Обґрунтування вибраної конструкції ферментеру.....	95
5.2. Конструктивний розрахунок.....	101
5.2.1. Розрахунок механічного перемішуючого пристрою.....	103
5.2.2. Розрахунок глибини воронки.....	104
5.2.3. Розрахунок потужності, що витрачається на перемішування.....	105
5.2.4. Розрахунок потужності привода мішалки.....	105
5.2.5. Тепловий розрахунок.....	107
5.3 Вибір загальнозаводського обладнання.....	113
5.4. Вимоги до охорони праці та навколишнього середовища.....	114
ВИСНОВКИ.....	117
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ.....	118

ВСТУП

Актуальність теми. На сьогодні єдиним економічно прийнятним у промислових масштабах способом одержання β -каротину є мікробіологічний, заснований на спільному культивуванні двох статевих форм міцеліального грибу *Blakeslea trispora*. Біомаса продуценту виступає вихідною сировиною для створення і випуску широкого асортименту каротинвмісних продуктів, попит на які, завдяки антиоксидантним і радіопротекторним властивостям β каротину, щорічно зростає у різних галузях народного господарства багатьох країн світу. Тому з боку фахівців - біотехнологів, мікологів, генетиків значна увага приділяється питанням інтенсифікації біосинтезу, збільшення обсягів промислового випуску каротинвмісної біомаси, які дозволили б забезпечити потреби ринку у даній продукції, зробити її конкурентоспроможною, а саме виробництво – прибутковим. Дослідження при цьому спрямовані на підвищення продуктивності грибної культури, розробку нових препаративних форм кінцевого продукту. Задача інтенсифікації процесів промислового одержання каротинвмісної біомаси і продуктів на її основі є актуальною, від її вирішення залежить стратегія подальшого розвитку технології, галузей, що використовують дану продукцію, ринку споживання, матеріально-технічний, економічний стан виробництва, його майбутнє. Одним із можливих шляхів вирішення даної задачі є удосконалення чинних і розробка нових технологічних режимів на основних стадіях виробництва, які дозволили б інтенсифікувати відповідні процеси, поліпшити їхні техніко-економічні показники та якість кінцевих

					ПБ.БТ6201.ДП			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат				
Розробив		Бездрабко А.Д.			ВСТУП	Стадія	Аркуш	Аркушів
Консульт.							9	122
Керівник		Литвинов Г.С.				КПІ ім. І. Сіверського ФСТ		

продуктів.

					ПБ.БТ6201.ДП			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат				
Розробив		Бездрабко А.Д.			ВСТУП	Стадія	Аркуш	Аркушів
Консульт.							9	122
Керівник		Литвинов Г.С.				КПІ ім. І. Сіверського ФСТ		

Активність вітаміну А мають ті каротиноїди, до складу молекул яких входить кільце β -іонуна (3,4-дегідроіонуна), зв'язане з аліфатичним ланцюгом, який містить систему супряжених подвійних зв'язків. Серед каротиноїдів найбільшу біологічну активність має β -каротин. Вважається, що крім найбільш вивченої функції як провітаміну А, каротиноїди самі по собі виконують захисні функції при дії вільних радикалів, ліпідних пероксидів, неспецифічних активаторів імунної відповіді в організмі.

Основною сировиною для одержання каротину є морква, гарбуз, обліпіха, люцерна, але сучасні успіхи біотехнології дозволяють в значній мірі вирішувати проблеми виробництва каротину з інших джерел. Такими джерелами можуть бути одноклітинні водорості, бактерії, міцеліальні гриби.

Каротиноїди містяться у багатьох мукових грибах, для деяких видів яких характерний надсинтез і вони використовуються для промислового одержання каротину. Для мікробіологічного одержання каротину особливий інтерес мають гетероталічні гриби порядку Mucorales: *Phycomyces blakesleanus* і *Blakeslea trispora* та зелена одноклітинна мікроскопічна водорість *Dunaliella salina*.

До теперішнього часу каротин, одержаний при культивуванні *Blakeslea trispora*, використовувався як харчовий продукт для забарвлення масла, маргарину, сиру, морозива і в невеликій кількості як вітамінний додаток в продуктах харчування. Крім того у сільському господарстві використовують біомасу, що містить натуральні каротиноїди, як добавку до раціону годування тварин та птахів.

Найбільші підпр-ва Вітамінної промисловості функціонують в Одесі («Біостимулятор»), Умані («Вітаміни»), Києві («Київський вітамінний завод», «Дарниця», «Борщагівський хіміко-фармацевтичний завод», «Київмедпрепарат»), Харкові («Червона Зірка»), Львові («Галичфарм»), Дніпропетровську («Дніпрофарм»), Лубнах Полтав. обл. («Лубнифарм») тощо. Вітчизняна вітамінна продукція не поступається аналогічній продукції західних країн і відповідає міжнародним стандартам якості.[1]

Розширення сфер застосування натуральних каротиноїдів та збільшення асортименту вже існуючої продукції, що містить β -каротин вимагає збільшення та вдосконалення промислового виробництва мікробіологічного каротину з біомаси грибу *Blakeslea trispora* в Україні.

					ПБ.БТ6201.ДП	Арк.А
Зм.	Арк.А	№ докум.№	ПідписПі	Дат		10

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

1.1. Основні промислові продуценти

Мікроорганізми, так як і рослини, також активно синтезують бета-каротин. В 1961 році із епіфітної мікрофлори жита був виділений активний біосинтетик бета-каротину *Mycobacterium phei*. Крім *Mycobacterium phei* відомий також цілий ряд мікобактерій, активно синтезуючих каротиноїди. Це, перш за все, *Mycobacterium stegmatis*, *Mycobacterium lacticum*, *Mycobacterium brevicoli*. Активними біосинтетиками каротиноїдів також являються бактерії видів *Mycrococcus glutamicus*, *Mortirela rommaniana*, *Mycrococcus roseum*, бактерії роду *Pseudomonas*, фітопатогенні мікоплазми сімейства *Mycoplasmataceae* та *Acholeplasmataceae*, актиноміцети помаранчевої групи, проактиноміцети, корінеформні бактерії та дріжджі: *Actinomyces aureomonopodiales*, *Actinomyces aur coverticillatus*, *Actinomyces chryzomallus*, *Streptomyces medilary*, *Corinebacterium poinsetiae* та ін.[2]

Каротиноїди продукуються також дріжджами роду *Rhodotorulla*, *Sporobolomyces* (*R. flava*, *R. glutinis*, *R. rubra*, *Sp. roseus*) та ін. Каротиноїди містяться в хлоропластах водоростей *Euglena*, *Ulva*, *Cyanophyta*, *Chlorella*, *Sconodesmus*, *Dunaliella salina* та ін.

Водорість *Dunaliella salina* використовується в країнах з теплим кліматом та тривалим періодом інтенсивної сонячної активності (Австралії, Ізраїлі, США) для отримання каротиновмісної біомаси, каротиноїдних паст та інших комерційних продуктів. Вихід бета-каротину з використанням цієї водорості сягає 14 % (у перерахунку на абсолютно суху біомасу). Водорості

					ПБ.БТ6201.ДП		
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат			
Розробив	Бездрабко А.Д.				РОЗДІЛ ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА	Стадія	Аркуш
Консульт.						Д	11
Керівник	Литвинов Г.С.					Аркушів	122
					1.	КПІ ім. І. Сікорського. ФБТ	

вирощують у великих водоймищах, поблизу солоних озер в місцях з високою сонячною активністю. Для збагачення водорості каротином використовують дуже цікавий захід — різко збільшують концентрацію солі у воді. Біомаса дуналієли містить (в 1 кг) до 30 г каротину, 400 г гліцерину, велику кількість білку. Вченими ВНДІ біотехніка (Москва) на основі біомаси *Dunaliella salina* були відпрацьовані технології виробництва вітамінних концентратів з різним вмістом каротиноїдів (80 мг/г; 200 ? 250 мг/г біомаси). [3]

Перспективним джерелом каротиноїдів може бути й інша водорість — спіруліна; вміст каротиноїдів в біомасі цієї водорості складає 300—600 мг %. Але до початку 60-х років вчені прийшли до висновку, що всі ці бактерії, водорості та гриби не можуть бути використаними в промислових ферментаційних процесах з причини низької швидкості та продуктивності біосинтезу бета-каротину.

Найбільш продуктивним продуцентом бета-каротину являється муковий гриб *Blakeslea trispora* (*Choanephora trispora*) класу *Phycomycetes*. Звичайно, й інші гриби роду *Choanephoraceae* (*Ch. cucurbitarum*, *Ch. circinans*, *Ch. heterospora*, *Ch. infuddibulifera*) здатні синтезувати каротиноїди, особливо при сумісному вирощуванні “плюс” та “мінус” форм в аерованій культурі та на сприятливому середовищі живлення. Для грибів цього роду суттєву роль в продукції каротиноїдів відіграють статеві гормони — триспорові кислоти.[5,6,7]

Вперше бісексуальність в нищих грибів була відкрита в 1904 році англійським вченим Блекслі, який вивчав умови утворення зигоспор у *Rhizopus nigricans*, а пізніше — у інших грибів; саме Блекслі ввів термін “гетероталлізм”. В 1956 році вперше були отримані натуральні каротиноїди (бета-каротин, лікопін та ксантофіл) ферментативним шляхом з використанням мукових грибів сімейства *Choanephora*. Вперше на ці мікроорганізми, як продуценти каротиноїдів, звернув увагу англійський вчений Барнет (1956 р.), пізніше — американський дослідник Циглер (1965

					ПБ.БТ6201.ДП	Арк.
						12
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

р.), радянські вчені В.Д. Кузнецов (1966 р.), М.Н. Бехтерева (1969 р.), Г.К. Скрыбін (1966 р.). Деякими дослідниками (Циглер, Є.М. Вакулова, С.М. Бобнева та ін.) були вказані спеціальні умови вирощування мукорових каротинсинтезуючих грибів, зокрема *Blakeslea trispora*, методом глибинного культивування при певних співвідношеннях міцелію різних статевих форм. Було виявлено, що введення в культуральну рідину або в поживне середовище для ферментації альфа- та бета-іононів або інших терпеноїдів значно стимулює біосинтез бета-каротину. А використання антиоксидантів, таких як іонол, сантохін, агідол та ін., попереджає процеси перекисного окислення каротиноїдів при висушуванні та зберіганні каротиномісткої біомаси. Подальші дослідження були направлені на модифікацію поживних середовищ та на зменшення взаємозалежності різних статевих форм гриба під час біосинтезу каротиноїдів. [8]

Великим плюсом технології з використанням нищого грибу *Blakeslea trispora* було те, що в процесі ферментації він накопичує велику кількість біомаси а також те, що цей гриб може рости на дешевих субстратах. Для біосинтезу каротиноїдів використовуються як спори, так і вегетативний міцелій “плюс” та “мінус” статевих форм гетероталічного грибу *Blakeslea trispora*. [9]

1.2 Систематичне положення

царство :	Гриби
Відділ :	Мукороміцети
порядок :	мукорові
сімейство :	<i>Choanephoraceae</i>
рід :	<i>Blakeslea</i>
вид :	<i>Blakeslea trispora</i>

1.3. Морфолого-цитологічні ознаки

Гетероталлічний (роздільностатевий) вид. Утворює великі (60-90 (180) мкм в діаметрі) сферичні многоспорові спорангії, часто з коронкою, спочатку білого кольору, потім темніють до темно-коричневих, а також спорангіолі - дрібні яйцеподібні спорангії $10-16 \times 8-12$ мкм. Вегетативний міцелій цього грибу складається із ниткоподібних гіфів діаметром від 2 до 20 μ m; гіфи деяких із штамів цього грибу мають дрібні лопастні вирости або здуття та незабарвлену оболонку. Вміст протопласту молодих гіфів гомогенний із слабкою базofilією; з часом при старінні міцелію в них можуть з'являтися вакуолі та безбарвні або золотаво-оранжеві (різні за інтенсивністю забарвлення) ліпідні включення, а при сумісному вирощуванні "плюс" та "мінус" форм — кристали каротину та його попередників. Безстатеве розмноження лише спорангіальне, представлене стілоспорангіями та спорангіями. На міцелії грибу можуть також утворюватися хламідоспори.

Хламідоспори інтеркалярні, широкоелліптичні до веретеновидних або неправильної форми, $13-28 \times 11-20$ мкм. [8,9]

Статевий процес у *Blakeslea trispora* зигогамний (гаметогамний), при якому відбувається з'єднання (кон'югація) двох специфічних клітин — гаметангіїв одного або різних таломів і утворення зигоспори. Дослідники, які працювали з нищими гетероталічними грибами, звернули увагу на той факт, що утворенню зигот звичайно передуює поява яскраво-помаранчевої каротиновмісної смуги, розташованої в місці контакту міцеліїв різних статевих знаків.

Це спостереження дозволило встановити корелятивний зв'язок між статевим процесом та каротиноутворенням у фікоміцетів. Взаємозалежність цих процесів була встановлена після того, як були виділені специфічні сполуки терпенової природи — триспорові кислоти, які, як вже зазначалося, являються статевими гормонами (прогормонами) і в декілька разів прискорюють біосинтез каротиноїдів, особливо "мінус" статевої форми.

					ПБ.БТ6201.ДП	Арк.
						14
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

Під час біосинтезу каротину мікроорганізмами він накопичується в клітинах продуцента. Власні жири гриба *Blakeslea trispora* складають до 60% всієї біомаси, що сприяє розчиненню каротину при ферментації. Це відповідно підвищує його доступність для засвоєння. Технологія отримання мікробіологічних каротиноїдів є екологічно чистою через відсутність шкідливих викидів і застосування неагресивних хімічних речовин.

1.4. Культуральні ознаки

У культурах зігоспорангії з'являються на поверхні і всередині субстрату, пофарбовані, з численними незабарвленими зігоспора.

Культури спочатку білі, потім з жовтими плямами. Повітряний міцелій НЕ септований, в різного ступеня розвинений. Спорангіофори в основному на субстратном міцелії.

1.5. Фізіолого-біохімічні ознаки

Триспорові кислоти та вітамін А являються природними стимуляторами біосинтезу каротиноїдів у *Blakeslea trispora*. Крім того, триспорові кислоти за своєю хімічною природою близькі не лише до вітаміну А, але й до іншого неприродного стимулятора біосинтезу каротиноїдів — бета-іонону, який діє в середовищах, що містять рослинні олії, багаті на лінолеву кислоту. Стимуляторами каротиноутворення також слугують деякі аміди, лактами, гідразини, заміщені піридини, зокрема сукцинамід, який здатний майже втричі збільшувати кількість каротиноїдів при сумісному культивуванні (+) та (–) штамів грибу *Blakeslea trispora*. Ці сполуки діють як стрес-фактори, порушуючи гомеостаз, в результаті цього відбувається інтенсифікація синтезу вторинних метаболітів, зокрема бетакаротину та лікопіну.

Наразі сировиною для біосинтеза бета-каротину являється харчова сировина (кукурудзяна та соєва мука, рослинні олії), відходи

					ПБ.БТ6201.ДП	Арк.
						15
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

крохмалепатокового виробництва (патока кукурудзяна зелена, рідкий кукурудзяний екстракт), мінеральні солі (калій дигідрофосфат) та вітаміни (тіаміну хлорид).

Соєва мука (2,3 % заг. об.) містить амінокислоти та білки, зв'язані дисульфідними зв'язками. Під час вирощування культури гриба в колбах споживається менш ніж 60 % амінокислот, решта залишається неутілізованою. Дослідження показали, що продуцент не проявляє ауксотрофності за окремими амінокислотам і здатний самостійно синтезувати майже всі амінокислоти, відповідно до своїх потреб. Середовище для вирощування маточної культури гриба-продуцента збагачують дигідрофосфатом калію та вітаміном В1. Вітамін В1 сприяє зростанню біомаси в 1,1—1,5 рази в широкому діапазоні концентрацій ($1 \cdot 10^3$ — $1 \cdot 10^7$ мкг/дм³). Крім цього, він позитивно впливає на синтез каротиноїдів — при концентрації тіамінхлориду $2 \cdot 10^4$ мкг/дм³ поживного середовища вихід каротиноїдів зростає на 5—10 %.

Мікроорганізм-продуцент каротиноїдів *B. trispora* дуже чутливий до впливу температури та до інфекції, тому на всіх стадіях технологічного процесу намагаються підтримувати постійну температуру (28 ± 1) °С та стерильність.

β -каротин накопичується у міцелії, а синтез стимулюється триспориновими кислотами, такими як β -іонон, за допомогою контролю позитивних зворотних зв'язків [11]. У мутантному штамі *B. trispora*, вирощеному з додаванням β -іонону, біомаса, що містить 30 мг β -каротину.г — 1 сухої маси, може вироблятися з контрольованим додаванням кисню та контролем віку фази вегетативного росту через 5-6 днів [12]. Показано, що світло також стимулює синтез каротиноїдів, хоча ступінь фотоіндукції каротеногенезу змінюється залежно від довжини хвилі та тривалості

					ПБ.БТ6201.ДП	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		16

експозиції [11].

Ферментація в ферментерах здійснюється на уніфікованому середовищі, яке містить дешеві відходи крохмалепатокового виробництва — зелену кукурудзяну патоку та кукурудзяний екстракт (джерело фосфору, вітамінів, азоту). В середовищі для ферментації, окрім цих компонентів, також міститься близько 2,0 % рослинної олії, яка необхідна для каротиноутворення.

Склад поживного середовища для посівних апаратів підібраний таким чином, щоб не відбувалося лімітування гриба-продуцента за поживними речовинами — як показали дослідження, ріст грибу та накопичення біомаси відбувається значно краще на багатих середовищах, що містять певні надлишки амінного азоту та фосфору (відповідно на 20—30 % та на 50—60 %) і не обмежені за редукувальними речовинами. Зелена патока містить, в основному глюкозу, дицукриди, продукти неповного розпаду крохмалю, меланоїдини. Як свідчать дослідження, глюкоза та мальтоза являються найкращими цукрами для синтезу біомаси, але надлишок певних цукрів (особливо глюкози) може негативно впливати на синтез вторинного метаболіту — бета-каротину. Мальтоза, навпаки, не інгібує каротиноутворення. Спирти (манніт, сорбіт, інозит, дульцит) а також рамноза (дезоксичукор) та арабіноза (пентоза) асимілюються грибом значно гірше, тому накопичення біомаси на цих субстратах незначне.

Біосинтез каротиноїдів відбувається за загальною схемою синтезу ліпідів ізопреноїдної (терпенової) групи, тому склад жирних кислот рослинних олій, які використовуються для біосинтезу, має суттєве значення. Стимулюючий вплив на каротиноутворення мають ненасичені жирні кислоти

					ПБ.БТ6201.ДП	Арк.
						17
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

— ліолева, олеїнова, ліолонова, характерні для соєвої, соняшnikової, кукурудзяної та інших видів олій.

Екзоліпазна активність грибу досягає максимального значення на 30 та на 80—95 годинах ферментації. Другий пік екзоліпазної активності може спостерігатися на 80—95 годинах. Він пов'язаний із зростанням жирності біомаси за рахунок власного ліпогенезу. Звичайно, при скороченні тривалості процесу ферментації до 60—70 годин та при 23 відсутності ліпідних підживлень на 35—47 годин ферментації другий пік екзоліпазної активності не спостерігається. Поживне середовище для ферментації містить 90—125 мг % амінного азоту, джерелом якого являється рідкий кукурудзяний екстракт. Під час ферментації споживається лише 65—70 % амінного азоту, який міститься в середовищі. Однак практика показує, що каротиноутворення муковим грибом *Bl. trispora* відбувається більш ефективно, якщо вміст амінного азоту в поживному середовищі не нижче 70 мг %. Встановлений прямий корелятивний зв'язок ($R = 32\%$) між початковою концентрацією амінного азоту в поживному середовищі та каротиногенезом.

Деякі технологічні процеси отримання каротиноїдів передбачають використання в складі поживних середовищ недефіцитних джерел азотного харчування, зокрема неорганічних форм азоту: нітратів, солей амонію, нітритів, карбамідів. Особливо перспективним джерелом азотного харчування являються солі амонію (хлорид, сульфат) та сечовина.

Джерелом вуглеводів в поживному середовищі для біосинтезу каротиноїдів слугує зелена кукурудзяна патока, гідрол, глюкоза та ін. Кількість редукувальних речовин в середовищі для ферментації повинно становити 0,9—1,2 %. Редукувальні речовини швидко утилізуються

					ПБ.БТ6201.ДП	Арк.
						18
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

мікроорганізмом вже під час трофофази (до 70 %), яка триває до 27—30 год ферментації; протягом ідіофази споживається решта цукрів.

При збільшенні концентрації глюкози в середовищі для ферментації понад 1,2 % спостерігається глюкозна репресія каротиногенезу. Концентрація глюкози понад 1,7 % статистично достовірно пригноблює 24 каротиноутворення, але позитивно корелює з виходом біомаси (в діапазоні 0,9—2,7 %).

Оптимальне значення рН поживного середовища для ферментації 5,9—6,4. Збільшення рН поживного середовища понад 6,4 приводить до зниження інтенсивності біосинтезу каротиноїдів. Крива рН під час біосинтезу має складний характер. На початку біосинтезу (протягом перших декількох годин ферментації) рН культуральної рідини знижується на 0,1—0,3, а після 15—20 годин вирощування починає знову зростати, поступово досягаючи до 36 годин початкового рівня кислотності. До кінця ферментації відбувається плавне зростання рН культуральної рідини до 6,7—7,1. Закислення середовища в перші години ферментації пояснюється накопиченням органічних кислот, особливо піровіноградної. Зростання значення рН культуральної рідини до кінця ферментації пов'язане з виділенням лужних речовин, в тому числі аміаку, в результаті процесів автолізу.

Каротиноутворення культурою *B. trispora* здійснюється за будьякого насичення середовища киснем, однак існує вузький його діапазон, характерний для максимального утворення β -каротину – 20-30 %, вище і нижче якого утворення метаболіту проходить з меншою швидкістю і для даного продуценту не підтверджуються положення про додаткову активацію механізмів біосинтезу каротиноїдів у відповідь на обмеження дихання чи,

навпаки, зростання концентрації кисню.

Також встановлено, що максимальна на діючому обладнанні частота обертання мішалки 185 хв⁻¹ сприяє інтенсифікації процесів споживання субстратів культурою і додатковому посиленню біосинтезу обох продуктів (рис. 1.5.1, а), однак це не пов'язано з впливом на концентрацію розчинного газу, яка в інтервалі 140-185 хв⁻¹ лишається майже на одному рівні (рис. 1.5.1., б), а лише з поліпшенням масообміну в системі рідина – біомаса продуценту.[19]

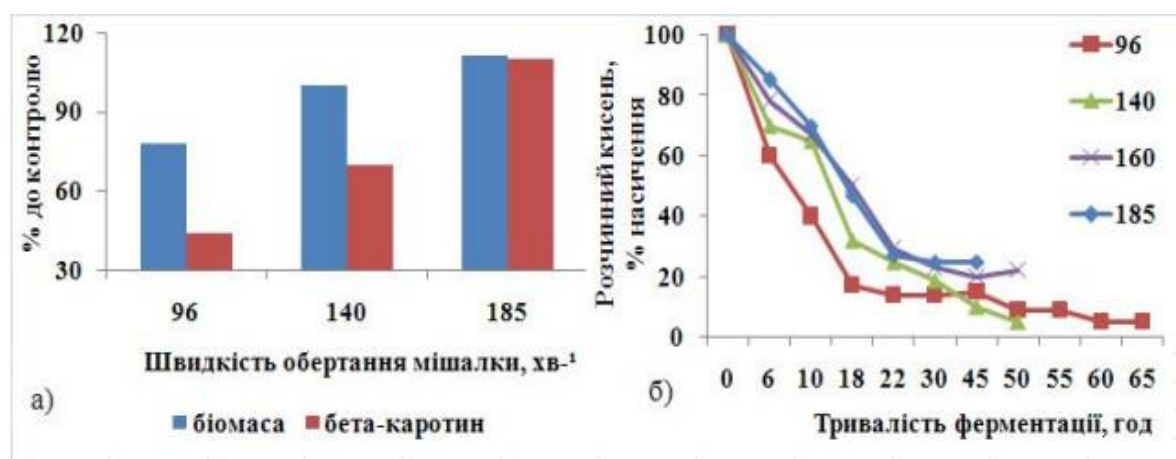


Рис.1.5.1. Основні показники біосинтезу за різної швидкості перемішування середовища (хв⁻¹): а) вміст цільових продуктів наприкінці ферментації; б) pO₂ .[19]

2. БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ВИРОБНИЦТВА

2.1 Характеристика кінцевого продукту

Вітамін А входить в групу жиророзчинних вітамінів і включає в себе ряд близьких за структурою сполук:

- о ретинол (вітамін А-спирт, вітамін А1, аксерофтол);
- о дегідроретінол (вітамін А2);
- о ретиналь (ретинен, вітамін А-альдегід);
- о ретінолевая кислота (вітамін А-кислота);
- о ефіри цих же речовин і їх просторові ізомери.

Каротиноїди - назва вітамінів групи А (походить від англійського слова carrot (морква). Джерелами каротиноїдів є рослини, деякі гриби і водорості, коли вони потрапляють в організм, то можуть перетворюватися на вітамін А. До каротиноїдів відносяться а, b і d-каротин, лютеїн, лікопен, зеаксантин. Відомо лише близько п'ятисот каротиноїдів.

Являють собою поліненасичені сполуки терпенового ряду, побудовані здебільшого за єдиним структурним принципом: на кінцях полієнового ланцюга, що містить 4 ізопреноїдних залишки, розташовуються циклогексанові кільця, або аліфатичні залишки. У більшості випадків містять 40 вуглецевих атомів. Ці речовини поділяють на каротиноїдні вуглеводні, С40–ксантофіли, гомо-, апо- і нор-каротиноїди. З рослинних матеріалів каротиноїди можуть бути виділені екстракцією розчинників, що не містять пероксидів, під розсіяним світлом в інертній атмосфері з подальшим омиленням та хроматографічним розділенням. Основні - α -, β -, γ -, ϵ -каротини та лікопін.

					ПБ.БТ6201.ДП		
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат	РОЗДІЛ 2. БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ВИРОБНИЦТВА		
Розробив	Бездрабко А.Д.						
Консульт.							
	Литвинов						
					Стадія	Аркуш	Аркушів
						21	122
					КПІ ім. І. Сікорського. ФБТ		

α -каротин - червоні кристали; містяться у тих ж рослинах, що і β -каротин, але у значно меншій кількості (до 25 % від вмісту β -каротину). При нагріванні з етилатом Натрію частково перетворюється у β -каротин; оптично активний ($[\alpha]_D^{+315}$) [13, 17].

Лікопін - кристали червоно-фіолетового кольору, червоний пігмент томатів. Лікопін виділяють з томатів та за допомогою мікробіологічного синтезу як β -каротин. С40-ксантофіли містять у ізопреноїдному ланцюзі одну або кілька гідроксильних, алкоксильних, епоксидних, альдегідних або кетоних груп. У природі розповсюджені лютеїн (Ie), віолоксантин (Iж) (II), фукоксантин (III), кріптоксантин (Iз), кантоксантин (I, R= R'=ж), астаксантин (I, R=R'=з) та інші, [14, 17, 13].

Усі вони добре розчинні у хлороформі (CHCl₃), сірковуглеці (CS₂) і бензені (C₆H₆), гірше - в діетиловому ефірі, гексані, жирах та оліях. Легко приєднують кисень повітря, нестійкі на світлі та при нагріванні в присутності лугів. З розчином хлориду сурьми (SbCl₃) у хлороформі (CHCl₃) дають характерне синє забарвлення ($\lambda_{\text{макс}}$ 590 нм).

β -Каротин - темно-рубінові кристали; у природі розповсюджений у вигляді найбільш стабільного транс-ізомеру за всіма подвійними зв'язками. У розчинах під дією світла, при нагріванні або додаванні йоду частково ізомеризує у цис-ізомери [13, 15, 16]. Найвідоміший каротиноїд і є провітаміном вітаміну А (в результаті окислювального розщеплювання в печінці β -каротин перетворюється на вітамін А), - C₄₀H₅₆, жиророзчинний помаранчево-жовтий пігмент .

Активність вітаміну А мають ті каротиноїди, до складу молекул яких входить кільце β -іонуна (3,4-дегідроіонуна), зв'язане з аліфатичним

					ПБ.БТ6201.ДП	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		22

Каротиноїди промислового біотехнологічного препарата з *Blakeslea trispora* представлені на 90 % β -каротином і на 10 % - α -, γ -каротинами та лікопіном.[15]

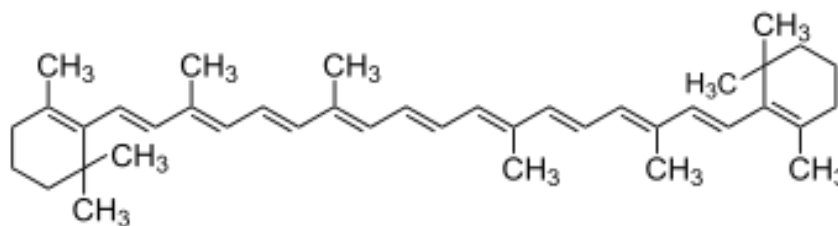
[illegible]C[C@H](C)/C=C/C[C@@H](C)/C=C/C[C@H](C)/C=C/C[C@@H](C)/C=C/C[C@H](C)/C=C/C[C@@H](C)/C=C/C[C@H](C)/C=C/C[C@@H](C)/C=C/C[C@H](C)/C=C/C[C@@H](C)/C=C/C

Рис.2.3. Молекула лікопіну

					<div> <div>ПБ.БТ6201.ДП</div> <div>Арк. 23</div> </div>
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат	

2.2 Схеми хімічних перетворень

1. Утворення первинного C5-попередника.

Стартовою сполукою в біосинтезі каротиноїдів є ацетат. Дві молекули ацетил-КоА конденсуються з утворенням ацетоаце-тил-КоА, який в свою чергу конденсується ще з однією молекулою ацетил-КоА,

утворюючи 3-гидрокси-3-метилглутарил-КоА. При відновленні цієї сполуки утворюється мевалонова кислота (МВК), остання в присутності АТФ фосфорилується з утворенням пірофосфату МВК. У присутності АТФ шляхом декарбоксилювання і дегідрування пірофосфат МВК перетворюється в 5 вуглецеву ізопренову одиницю - ізопентенілпірофосфат. (рис.2.4).

2. Біосинтез безбарвних C40-полієнів з C5-попередника.

Ізопентенілпірофосфат (ІПФ) ізомеризується до стадії диметилалілпірофосфата (ДМАПФ). Потім відбувається конденсація ІПФ і ДМАПФ з утворенням геранілпірофосфата (ГПФ-синтазою). Ці сполуки, що містять 10 атомів вуглецю, конденсуються з ІПФ і утворюють фарнезилпірофосфат (ФПФ-синтазою), з якого шляхом подальшої конденсації виникає 20-вуглецева одиниця – геранілгеранілпірофосфат (ГГПФ-синтазою). Останній димеризується (Фітоїн-синтазою), утворюючи фітоїн (7,8,11,12,7', 8', 11', 12' -октагідро-ш-ш-каротин) - перший C40-попередник каротиноїдів.

					ПБ.БТ6201.ДП	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		24

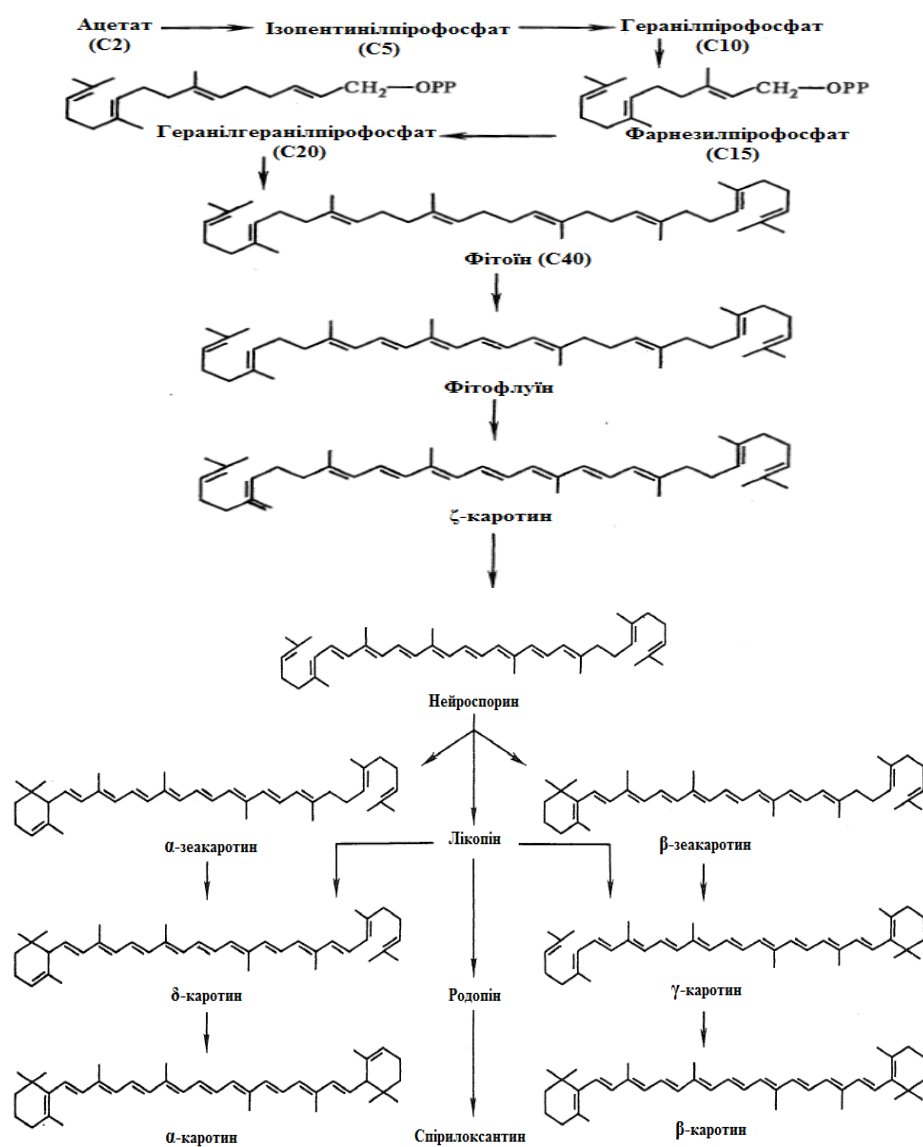


Рис.2.4.– Біосинтез каротиноїдів мікроорганізмами [18]

Центральний хромофор фітоїну, що складається з трьох спряжених подвійних зв'язків, передбачає існування кількох стереохімічних ізомерів. В природних об'єктах фітоїн представлений двома ізомерами: 15-цис- і 15-транс-фітоїн. Як правило, перший ізомер переважаючий, другий - зустрічається у вигляді слідів. Однак у деяких мікроорганізмів весь фітоїн може бути представлений 15-транс-ізомером. Характер ізомеру фітоїну визначає конфігурацію наступних попередників біосинтезу каротиноїдів, зокрема фітофлуїну.

3. Кінцеві стадії синтезу каротиноїдів (дегідрування, циклізація, введення кисневмісних груп і C5-одиниць). Утворення каротиноїдів з фітоїну відбувається при послідовному дегідруванні останнього (фітоїн-дегідрогеназою). Першим продуктом цієї реакції є C40-поліен-фітофлуїн. При подальшому дегідруванні фітофлуїну утворюються вже забарвлені каротиноїди - нейроспорин і лікопін (рис.2.4.). Ці сполуки піддаються потім послідовній циклізації (лікопін-циклаза), з утворенням полієнів, що містять α - або β -іононові кільця (наприклад, α - або β -каротинів). Використання нейроспорину або лікопіну як проміжного продукту при біосинтезі каротиноїдів залежить від умов вирощування та особливостей ферментної системи організму.

Встановлено, що α - і β -іононового кільця каротиноїдів утворюються із загального ациклічного попередника (рис.2.5.), механізм циклізації якого відрізняється в разі синтезу α - і β -іононового кілець. Із нейроспорину (або L-каротину) виникають α - і β -зеакаротини – попередники α - і β -каротинів відповідно. Введення кисневмісних груп в молекулу каротиноїдів відбувається зазвичай після закінчення процесу циклізації, тобто синтез ксантофілів здійснюється після утворення каротинів.

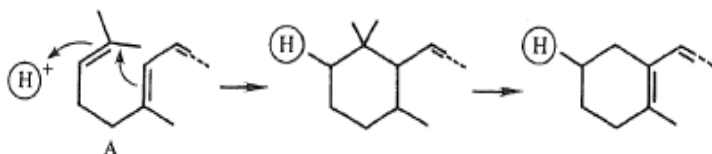


Рис. 2.5. – Механізм реакції циклізації при утворенні β -іононового кільця. А – загальний ациклічний попередник при утворенні α - і β -іононового кілець [18].

2.3 Характеристика компонентного складу біотехнологічного препарату, отриманого в процесі реалізації технології

Каротиноїди промислового біотехнологічного препарату з *Blakeslea trispora* представлені на 90 % β -каротином і на 10 % - α -, γ -каротинами та лікопіном.

Чистота препарату, що досягається внаслідок екстракції та очищення культурального середовища, має бути не менше 90%. Домішки, що складають до 10% готового продукту, представлені іншими представниками групи каротиноїдів та низькомолекулярними органічними сполуками.

При виробництві необхідно валідувати придатність кожного етапу екстракції й очищення щодо видалення і/або інактивації забруднюючих речовин з клітин хазяїна або живильного середовища, включаючи, зокрема, вірусні частки, білки, нуклеїнові кислоти і допоміжні речовини. Валідаційні дослідження проводять для того, щоб підтвердити, що процес виробництва регулярно витримує такі критерії:

- з продукту видалені сторонні агенти, і для кожної значущої стадії очищення визначають здатність до зменшення вмісту таких забруднень;
- з продукту в достатній мірі видалені вектор, клітини хазяїна, живильне середовище і залишки реактивів.
- вихід продукту з культури підтримується у встановлених межах;

Перед випуском кожної партії продукт випробовують на ідентичність, чистоту і проводить відповідне кількісне визначення, виконуючи цілий ряд хімічних, фізичних, і біологічних випробувань.

					ПБ.БТ6201.ДП	Арк.
						27
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

2.4 Методи очистки та виділення цільового продукту

Стадії виділення цільового продукту вітаміну (каротину) значно відрізняється в залежності від того, накопичується продукт в клітині або він виділяється в культуральну рідину, або ж продуктом є сама клітинна маса. Найбільш складно виділення продукту, що накопичується в клітинах. Для цього клітини необхідно відокремити від культуральної рідини, зруйнувати (дезінтегрувати) і далі цільовий продукт відчистити від маси компонентів зруйнованих клітин. Виділення продукту полегшується, якщо він вивільняється (екскретується) продуцентом культуральної рідини.

Першим етапом на шляху до очищення вітаміну є розділення культуральної рідини і біомаси - сепарація. Іноді сепарації передуює спеціальна обробка культури - зміна рН, нагрівання, додавання коагулянтів білка. Існують різні методи сепарації: флотація, фільтрація, центрифугування. Центрифугування і фільтрація в деяких виробничих процесах реалізуються в комбінації. Найбільш перспективною для осадження біомаси, що містить вітамін, є центрифуги-сепаратори, в яких біомаса осідає на стінки обертається циліндра.

Другим етапом на шляху до очистки цільового продукту є руйнування клітин. Руйнування клітин (дезінтеграція) проводять фізичними, хімічними, хіміко-ферментативними методами.

Найбільше індустріальне значення має фізичне руйнування:

- 1) ультразвуком;
- 2) за допомогою обертових лопатей і вібраторів- метод, що часто використовується в пілотних і промислових установках;

- 3) струшуванням зі скляними кульками;
- 4) Продавлювання через вузький отвір під високим тиском
- 5) розчавлювання замороженої клітинної маси;
- 6) розтиранням ступки
- 7) осмотичним шоком
- 8) заморожування-відтаювання
- 9) стисненням клітинної суспензії з наступним різким зниженням тиску (декомпресія).

Фізичні способи руйнування більш економічні, ніж хімічні, хіміко-ферментативні.

Обережне і виборче руйнування клітинної стінки можливо, при використанні хімічних і хіміко-ферментативних методів: лізис клітин антибіотиками, деякі поверхнево активними речовинами, а також гліцином; автолізу клітин при лімітованому за певним субстратом зростанні або їх лізис при зараженні бактеріофагами.

Виділення цільового продукту з культуральної рідини або гомогенату зруйнованих клітин проводять шляхом його осадження, екстракції або адсорбції.

Осадження розчинених речовин можливо фізичними (нагріванням, охолодженням, розведення або концентрування розчину) або хімічними впливами, що переводять відокремлюваний продукт в малорозчинний стан.

Екстракцію можна поділити на твердо-Рідкофазну, при якій з твердої фази переходить в рідку і рідко-Рідкофазну -- перехід продукту з однієї рідкої фази в іншу

До твердо-рідкофазної екстракції відноситься просте обливання твердого

					ПБ.БТ6201.ДП	Арк.
						29
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

зразка водою з метою вилучення з нього розчинних речовин, наприклад, солей металів з руд, підданих бактеріальної обробці, або розчинних продуктів з маси субстрату при твердофазном культивуванні.

Рідко-Рідкофазна екстракція органічних розчинників часто застосовуються для вилучення з культуральної рідини антибіотиків, вітамінів, каротиноїдів, ліпідів, деяких гідрофобних білків.

Повністю уникнути нагрівання, згубного для багатьох цінних речовин, дозволяють методи холодової екстракції (кріоекстракція). Кріоекстракція здійснюється розчинниками, що киплять при низьких температурах і знаходяться при кімнатній температурі в газоподібному стані.

Для екстракції неполярних органічних сполук можна використовувати рідкий пропан або бутан. При подальшому обережному нагріванні до нуля градусів Цельсія киплячий розчинник випаровується, і продукт залишається в чистому вигляді. Кріоекстракція може використовуватися в комбінації з кріоконсервацією клітин.[82]

Процедури вилучення.

Після закінчення бродіння колби виймають і ферментаційний відвар обробляють для екстракції β -каротину. Рідину центрифугують, поки супернатант не стане безбарвним. Осаджену біомасу сушать при 50 ° C у вакуумі до постійної ваги.

Біомасу подрібнювали пестиком, а частинки використовували для екстракції β -каротину за допомогою наступних процедур.

Спосіб А: Екстракція при постійній температурі та різних часах вилучення.

Біомасу обробляли різними розчинниками, такими як етанол, метанол,

ацетон, петролейний ефір, гексан і суміш гексану:метанол (1: 1) у співвідношенні 100 мл розчинника / г сухої маси біомаси. Екстракцію проводили в обертовому шейкерному інкубаторі при 30 ° С і при різному часі вилучення (30, 60, 90, 120 та 150 хв) при 300 об / хв.

Спосіб В: Екстракція при постійному часі та різній температурі вилучення.

Каротеноїдний пігмент витягувався з клітин при різних Температурах екстракції (30, 35, 40, 45 та 50 ° С) протягом 2 год. Розчинники були ті самі, що описано в Способі А, але замість петролейного ефіру -- ацетоновий та нафтовий ефір. У цьому випадку біомасу обробляли ацетоном при вищезазначених різних температурах протягом 2 год і екстракт центрифугували при 5000g протягом 20 хв. Екстракт ацетону декантували в воронку-сепаратор, змішану з рівною кількістю нафтового ефіру, і суміш акуратно струшували. Після додавання 20 мл дистильованої води, відбулося відділення двох фаз, і додали 5 г сульфату натрію

до шару нафтового ефіру. Суміш витримували при 4 ° С протягом 1 год, і спектри поглинання були отримані при 450 нм, використовуючи Zeiss PMQII спектрофотометр.

Спосіб С: Видалення β-каротину з клітин повторними екстракціями.

Каротиноїдний пігмент видаляли з клітин шляхом екстракції з абсолютним етанолом. Екстракцію β-каротину проводили в інкубаторі з обертовим шейкером при 300 об / хв протягом 2 год і при температурі, що була Оптимальною для кожного розчинника. Після 2 год екстракції, рідину центрифугували при 5000 г протягом 20 хв., супернатант видаляли, осад екстрагували свіжим розчинником. Виділенні повторюється чотири рази.

Найбільша кількість каротиноїдного пігменту, що виділяється з клітини

					ПБ.БТ6201.ДП	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		31

отримували за допомогою методу, при якому ферментаційний бульйон пропарювався при 121 ° С протягом 15 хв, а β-каротин видалявся безпосередньо з клітин шляхом екстракції етанолом без висушування біомаси. Перевага даної обробки над іншими методами може бути обумовлена такими причинами: окислення каротиноїдного пігменту під час висихання біомаси було відсутнє; була видалена активність ферментів, що викликають окислення β-каротину; і отримана клітинна пермеабілізація під час пропарювання, що дозволяє екстрагувати β-каротин з клітин. Як правило, результати показали, що попередня обробка ферментаційного відвару значно покращила вилучення β-каротину з *B. trispora*.

Максимальна кількість видалення β-каротину з клітин отримується екстракцією етанолом. В інших розчинниках, таких як ацетон, метанол:гексан (1:1), метанол, петролейний ефір та гексан, кількість β-каротину, вилученого з клітин, було нижчим на 45,0, 65,5, 67,0, 71,5 та 72,0 % відповідно. Результати показали, що етанол (розчинник, який досі не використовувався) був кращим розчинником для видалення β-каротину з клітин. Дві інші змінні, які можна взяти до уваги у процесі екстрагування відносяться співвідношення біомаси та розчинника концентрація розчинника. Розглянуто етанол у концентраціях 100, 60,

і 40% при співвідношенні 1: 100, 1:50 та 1:30 у сухій масі до біомаси. Результати показали, що концентрація 100% етанолу і співвідношення біомаси до розчинника 1: 100 дало максимальну кількість β-каротину, вилученого з клітини.

Описана тут процедура дозволяє відновити β-каротин з *B. trispora* шляхом нагрівання ферментаційного бульйону та екстракції каротиноїдного

					ПБ.БТ6201.ДП	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		32

пігменту етанолом. Спосіб відрізняється від описаного раніше застосуванням пропарювання ферментаційного бульйону та безпосереднього видалення β -каротину з клітин. Таким чином, проблема, пов'язана з окисненням β -каротину на стадії сушіння біомаси, була вирішена. Цей метод, порівняно з запропонованим іншими дослідниками, виявився точним, швидким та дуже відтворюваним. Більше того, кількість β -каротину, вилученого з *B. trispora*, було вищим, ніж кількість, видалена іншими методами.[81]

В лабораторних та промислових умовах каротин отримують наступним шляхом:

1. По закінченню виробничого культивування рідину нагрівають до 120 С на 15 хв,
2. Культуральну рідину екстрагують етанолом;
3. Для відділення клітин від культуральної рідини використовують центрифугування при 3000 об/хв протягом 10 хвилин на центрифугі Т-23 ;
4. Промивання екстракту водою
5. Проводять упарювання розчину для видалення залишків органічних розчинників та кристалізації каротину, охолодження.
6. Промивання етилацетатом, для осадження бетакаротину.
7. Сушка розпилювальна для досягнення чистоти 90-95%.

2.5 Механізми впливу цільового продукту на біохімічні процеси

Роль β -каротину в організмі безцінна з точки зору сучасних досягнень у науці. Для людини найбільший інтерес представляє натуральний β -каротин, транс-форма якого є найбільш біологічно активною. Довгий час β -каротин розглядали лише з погляду його здатності в живому організмі перетворюватися на вітамін А, проте спектр дії β -каротину набагато ширший. Вітамін А бере участь в окисно-відновних процесах, регуляції синтезу білків, допомагає нормальному обміну речовин, функції клітинних і

					ПБ.БТ6201.ДП	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		33

субклітинних мембран, відіграє важливу роль у формуванні кісток, зубів і жирових відкладень; потрібен для росту нових клітин, уповільнює процес старіння.

Центральне місце в метаболізмі каротину в печінці і кишечнику займає ретиналь, який відновлюється до ретинолу за участю НАД-залежної ретинальдегідроредуктази, щодо своєрідної до відновлення коротко- і середцепочечних аліфатичних альдегідів. Припускають, що в мікросомах клітин 12-палої кишки існує координована індукція ретиналь-редуктази і

β -каротин-15,15'-діоксигенази [29]. Ретиналь може всмоктуватися і в незмінному вигляді, перетворюючись в ретинол під дією названого ферменту в інших органах і тканинах [28,30]. У кишечнику і печінці активна ретинілдегідрогеназа, що каталізує утворення з ретинолу ретиналю, але реакція зрушена в бік ретинолу.

З клітин слизової оболонки тонкого кишечника виділена ретинальоксидаза, окислюючи ретиналь в ретиноеву кислоту [26]. Основна маса ретиноевої кислоти, на відміну від ретинолу і ретиналь, всмоктується НЕ через лімфатичні шляхи, а через ворітну вену і виводиться з жовчю у вигляді глюкуронідів [27].

Каротиноїди можуть всмоктуватися в кишечнику без біотрансформації. Включаючись до складу ліпопротеїнів, вони транспортуються в жирову тканину, печінку, надниркові залози, яєчники та інші органи, виконуючи там абсолютно самостійні функції [24,32,33]. Будучи специфічними адаптогенами, вони забезпечують захист і підвищення загальної резистентності організму при дії різноманітних стресорів [25,32]. В даний час

					ПБ.БТ6201.ДП	Арк.
						40
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

встановлено профілактичне і захисне дії β -каротину щодо захворювань, які супроводжуються окислювальним стресом (катаракта, хронічні інфекції, запалення, рак, серцево-судинна патологія та ін.) [34,35].

Антиоксидантні властивості багатьох каротиноїдів, і перш за все β -каротину [22,36,37,38], зумовлюють їх радіопротекторне [21,39,40], антимутагенну [41,42], імуномодулюючу [43], антиінфекційне, антиканцерогенну дії [44,45,46]. антиоксидантна активність β -каротину пов'язана з його здатністю блокувати утворення синглетного кисню - O^2 , поглинаючи енергію збудженого електрона без будь-яких хімічних перетворень, повертаючи O^2 в основне (тріплетне) стан без пошкодження навколишніх біологічних систем [47,48,49]. Крім β -каротину, здатністю «гасити» синглетний кисень мають також лікопін, астаксантин, α -, γ -каротин, зеаксантин, резерватол і інші каротиноїди [50,51]. Будучи компонентами неферментативної антиоксидантної системи, вони захищають клітинні структури від впливу активних форм кисню, не тільки «гасячи» синглетний кисень, але також нейтралізує перекисні радикали і обриваючи ланцюгові реакції вільнорадикального окислення ненасичених карбонових кислот [33,36,52,53,54], перешкоджаючи перекисного окислення ліпідних компонентів клітинних мембран [55,56,57]. Деякі дослідники вважають, що антиоксидантні властивості β -каротину перевершують такі токоферолу, триптофану, глутатіону, вітаміну А [31,42,58,59], тому що він уповільнює руйнування антиоксидантів вільними радикалами [23,60]. Спільне використання β -каротину, α -токоферолу, вітаміну С робить більш сильну антиоксидантну дію, ніж кожна речовина окремо [59,61].

Давно відомо, що вітамін А дуже добре впливає на зір: в давні часи

					ПБ.БТ6201.ДП	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		35

варену печінку (найкраще джерело вітаміну А) використовували від нічної сліпоти. Саме вітамін А забезпечує нормальну діяльність зорового аналізатора, впливає на фоторецепції, бере участь в синтезі зорового пігменту сітківки і сприйнятті оком світла.

Цей вітамін потрібен для гарного функціонування імунної системи людини і є невід'ємною частиною процесу боротьби з інфекцією. Якщо застосовувати Ретінол, то підвищиться бар'єрна функція слизових оболонок, зросте фагоцитарна активність лейкоцитів і інших чинників неспецифічного захисної системи організму. Вітамін А захищає нас від простуд, грипу та інфекцій травного тракту, дихальних і сечових шляхів. Відомий факт, що діти в розвиненіших країнах набагато легше переносять такі інфекційні хвороби як кір і вітряна віспа, а в країнах з низьким рівнем життя від таких інфекцій помирають. Саме наявність вітаміну А в організмі є одним з головних чинників цієї закономірності. Присутність в організмі вітаміну А продовжує життя навіть людям, які хворі на СНІД.

Шкіра і слизові покриви складаються з епітеліальних тканин, а ретінол необхідний для їх підтримки і відновлення. Адже не просто так всі сучасні косметичні засоби містять в своєму складі ретиноїди - синтетичні аналоги ретинолу. Вітамін А застосовується при лікуванні багатьох захворювань шкіри (акне, прищі, псоріаз і т.д.). При пошкодженнях шкіри (сонячні опіки, рани) вітамін А прискорює загоєння і стимулює синтез колагену, покращує якість знову утворюється тканини і знижує небезпеку інфекцій.

Через тісний зв'язок зі слизовими оболонками і епітеліальними клітинами вітамін А добре впливає на роботу легенів і є доповненням, що стоїть при лікуванні деяких захворювань шлунково-кишкового тракту, (виразки, коліти).

					ПБ.БТ6201.ДП	Арк.
						36
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

Ретинол необхідний для нормального ембріонального розвитку, харчування зародка і робить меншим ризик такого ускладнення вагітності, як мала вага новонародженого.

Вітамін А бере участь в синтезі стероїдних гормонів (включаючи прогестерон), сперматогенезе, є антагоністом тироксину - гормону щитовидної залози.

В-каротин і вітамін А є найсильнішими антиоксидантами і беруть участь в профілактиці і лікуванні ракових захворювань, і перешкоджають повторному появі пухлини.

В-каротин і вітамін А охороняють мембрани клітин мозку від руйнівної дії вільних радикалів. В-каротин нейтралізує найнебезпечніші види вільних радикалів: радикали поліненасичених кислот і радикали кисню.

Антиоксидантну дію β -каротину займає важливе місце в запобіганні захворювань серця і артерій, має захисну дію для хворих на стенокардію і підвищує вміст "корисного" холестерину в крові (ЛПВЩ). Одна молекула β -каротину може зв'язати 5–6 вільних радикалів. В-каротин перешкоджає утворенню бляшок, холестеринів, і наростанню ліпідних відкладень на стінках кровоносних судин. В результаті дії β -каротину на організм підвищується дієздатність імунної системи і збільшується стійкість організму до всього спектру захворювань.

Лютеїн і зеаксентин - найважливіші каротиноїди, які захищають очі: вони попереджають катаракту і знижують ризик дегенерації жовтої плями (головного органу зору), яке майже в кожному третьому випадку є причиною сліпоти.

Лікопін – ще один каротиноїд (міститься в помідорах). Він захищає від атеросклерозу, запобігає окисленню і накопичення на стінках артерій холестерину низької щільності. Більш того, це найдієвіший каротиноид при захисті від раку, особливо раку молочної залози, ендометрія і простати. [20]

					ПБ.БТ6201.ДП	Арк.
						37
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

РОЗДІЛ 3. МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ПРОДУЦЕНТІВ

3.1 Генетична вивченість біологічного об'єкту

3.1.1 Наявність генетичних карт продуценту або типового представника групи

Наразі проводяться роботи, направлені на зменшення вартості препаратів каротиноїдів, отриманих мікробіологічним шляхом. Це досягається використанням методів генної інженерії. Генноінженерні роботи здійснюються в двох напрямках:

- 1) гени, відповідальні за синтез ферментів біосинтезу певного каротиноїду, намагаються клонувати та експресувати в організми, здатні швидко рости на екологічно чистих та дешевих середовищах;
- 2) шляхи біосинтезу намагаються змінити в батьківському організмі таким чином, щоб перетворити його в надсинтетика каротиноїдів. [7]

Однак в обох випадках успіху перешкоджає відсутність точних відомостей про ферменти, які приймають участь у біосинтезі певних каротиноїдів. Можливо, гени можуть бути виділені шляхом подрібнення великих шматків ДНК; успіху може сприяти компактне розміщення генів, що кодують біосинтез каротиноїдів, у вигляді кластеру.

Серед нових напрямків біотехнології каротиноїдних сполук слід зазначити головні:

1. Інтенсифікація біосинтезу бета-каротину у *Blakeslea trispora* зеленим світлом (1,7 В/м²) протягом 48 годин, — світло використовується не для освітлення ферментера, а для отримання спорового матеріалу, вирощеного при фотодії;

					ПБ.БТ6201.ДП		
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат	РОЗДІЛ 3. МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ПРОДУЦЕНТІВ		
Розробив	Бездрабко А.Д.						
Консульт.							
	Литвинов Г.С.						
					Стадія	Аркуш	Аркушів
					Д	38	122
					КПІ ім. І. Сікорського. ФБТ		

2. Блокування на певній стадії шляху біосинтезу бетакаротину за допомогою певних сполук з метою отримання попередника бета-каротину — лікопіну.

3. Отримання поряд з каротиноїдами біологічно активних сполук убіхінонової природи: коензиму Q та ін.

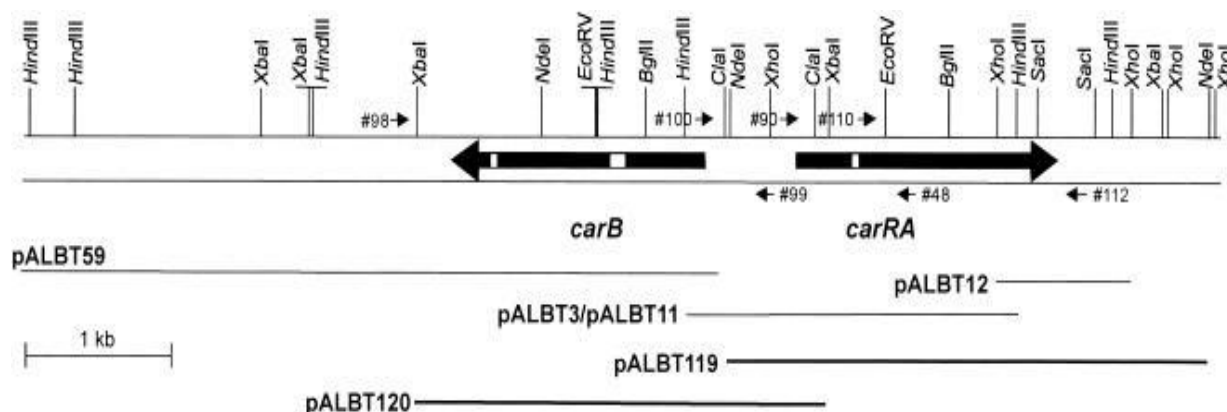


Рис.3.1. Рестрикційна Карта геномної області *B. trispora*, що містить гени *carB* та *carRA*. ORF та напрямок транскрипції показані великими стрілками. Білі області всередині стрілок являють собою інтрони. Маленькі стрілки вказують на праймери, які використовуються для ампліфікації ПЛР. Товсті лінії являють собою плазміди, які використовуються для трансформації *M. circinelloides*. [62]

3.1.2 Вивченість механізмів експресії генів, відповідальних за синтез цільового продукту, індукторів та репресорів процесу синтезу.

Нагромадження β -каротину у *B. trispora* сильно пов'язане із статевою взаємодією та збільшується у 5-15 разів під час спаровування [11], що відповідає наявності трьох можливих TR-коробок у промоторній області генів *carB-carRA*, якщо статевий розвиток опосередковується фактором

транскрипції, подібним до *Stel1*, у *B. trispora*.

Припущення про функцію генів на основі подібності послідовностей з генами інших організмів припускають, що спаровування викликає багато метаболічних змін. Підвищене виробництво каротину протягом спаровування викликало особливий інтерес. Менше генів *Blakeslea* були інгібовані спаровуванням, ніж викликані ним. Припускається, що в одиничних культурах відбувається мало процесів, які не відбуваються в спарених культурах. Це, ймовірно, пов'язано з виробництвом вегетативних плодоносних тіл (спорангіофори), які утворюються лише в одиночних культурах і придушуються спаровуванням, в той час як зигоспори формуються лише в парних культурах.

Експресія гена *carRA* в мутантному штамі MS8, дефіцитному в активності лікопен-циклази / фітоен-синтази, частково доповнює цю мутацію і відновлює мінімальну кількість продукування β -каротину. У трансформантах MS12 накопичення лікопену та γ -каротину на рівнях у три-сім разів вище, ніж у ATCC 1216b, говорить про те, що експресія *carB* та *carRA* певним чином відрізняється. Додаткові копії *carB* не збільшують вироблення каротиноїдів, але додаткові копії *carRA* - так. Цей ефект може бути зумовлений співвідношенням PALBT119 (*carRA*) / pALBT120 (*carB*) 20: 1.

					ПБ.БТ6201.ДП	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		40

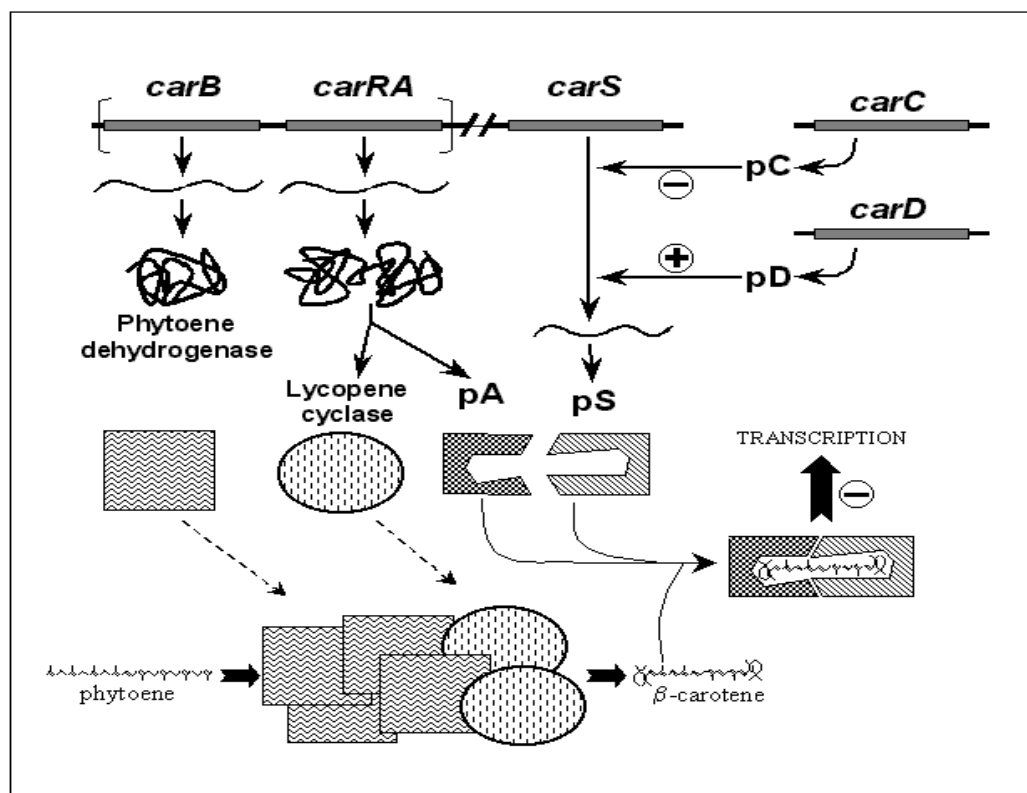


Рис.3.2. Схематичне зображення моделі біосинтезу β -каротину *P. Blakesleeanus* (подібно до *B.trispora*) [64].

Два тісно пов'язаних структурних гена (*carB* і *carRA*) дають три білки (після розщеплення *carRA* кодованого поліпептиду). Два з цих білків (фітоендегідрогеназа та лікопен циклаза) складаються в агрегат, який перетворює фітоен в β -каротин, а третій білок є одним з регуляторних білків, що утворює комплекс з β -каротином та pS, продуктом *carS*, діючи негативно на транскрипцію каротиногенних генів.

Виведені білки грибів, що кодують грибкуву фітоендегідрогеназу, мають тип crtI, здатний вводити чотири дегідрогенації для отримання лікопену. Вважається, що типи crtI та crtP фітоендегідрогенази еволюціонували як два неспоріднених типу білків. Однак певний еволюційний зв'язок не можна відкидати, так як обидва типи можуть бути

членами надсеме́йства FAD [66,67].

Один біфункціональний білок здійснює роль фітоенсинтази та лікопенциклазу у грибах. Існування біфункціонального гена (*carRP* у *M.circinelloides*, *carRA* у *P. blakesleeanus*, *crtYB* X. У *dendrorhous* та *al-2* з *N. crassa*) є особливістю, характерною для грибового каротеногенезу.

кДНК-AFLP (поліморфізм довжини фрагмента ампліфікованої ДНК) - це метод відбитків РНК, що дозволяє напівкількісне порівняння достатку вибраної підмножини фрагментів мРНК за різних умов [73, 74, 75]. Методика є надійною та відтворюваною [74,76], і її чутливість схожа на інші методи експресії генів, такі як мікромасиви [77]. Перевага кДНК-AFLP полягає в тому, що це не залежить від відомостей про геномної послідовності. Дуже небагато генів *Blakeslea*, які були секвеновані, включають гени для двох виділених ферментів для біосинтезу каротину [78], регулятора реакцій на світло, включаючи біосинтез каротину [79] та каротинова оксигеназа, ймовірно, бере участь у біосинтезі триспороїдів [80].

Регулювання рівня експресії гена. За винятком білкової інженерії та локалізованої експресії, зростаюча ефективність у заданому шляху пов'язана з рівнями експресії ферменту, який, як вважається, збільшує метаболічний потік до цільового виробництва. Посилена експресія гетерологічних або ендогенних білків пов'язані з різноманітними аспектами, включаючи промоторну інженерію, рибосомну інженерію сайту зв'язування (RBS), кількість копій генів та регуляція генів (Huo et al., 2019; Li et al., 2015a; Peti and Page, 2007). Вибіркові і мутуючі промотори з різних гетерологічних джерел були застосовані для поліпшення експресії генів в каротиноїдних модулях біосинтезу в бактеріях (Qiang et al., 2019) та дріжджах (Gao et al., 2017; Hara et al., 2014; Larroude et al., 2018) для каротиноїдного

					ПБ.БТ6201.ДП	Арк.
						42
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

надвиробництва. Крім того, інжиніринг RBS ключових ферментів в синтезі каротиноїдів також може збільшувати вироблення каротиноїдів у *E. coli* (Jin et al., 2015; Wang et al., 2009a; Ye та ін., 2010).

Ще одна стратегія покращення вироблення каротиноїдів - збільшити кількість копій гена ключових ферментів (Gao et al., 2017; Henke et al., 2016; Larroude et al., 2018; Ши та ін., 2019), оскільки числом копії гена може бути безпосередньо пов'язаний з рівнем експресії його білка (Huo et al., 2019).

Через генетичну нестабільність плазмід, застосовували «хімічно індуквану хромосомну еволюцію» для контролю інтеграції копії гена в хромосому за допомогою трикласової індукції (Chen et al., 2013a; Tuo et al., 2009) для надвиробництва каротиноїдів. Цей метод використовує RecA для опосередкування ДНК-схрещування між провідним та кінцевим гомологічним регіонами для інтеграції в геном високої копії. Крім того, Порядок генів в опероні впливав на вихід каротиноїдів, оскільки гени, віддалені від промотору в опероні, мають нижчий рівень експресії (Colloms et al., 2013; Xu et al., 2016b). Розщеплення цього великого оперона на менші оперони, що складаються з двох-трьох контрольованих генів сильним промоутером може усунути цю проблему та покращити загальний потік (Ye та ін., 2016). Промотором, що управляє модулем біосинтезу каротиноїдів, може бути репресований різними факторами транскрипції та репресорами, зменшуючи загальне виробництво каротиноїдів. Вибиваючи репресор crtR, наприклад, дерегулює оперон crt і призводить до багаторазового збільшення лікопену та β -каротину у *C. glutamicum* (Henke et al., 2017). Збільшуючи експресію кофактора також можна покращити активність ферментів. Кисень – це кофактор β -каротинової кетолази та гідроксилази, діяльність якої може бути збільшена введенням гена гемоглобіну від *Methylobionas sp.* 16a,

поліпшуючи конверсію астаксантину на 60% в *E.coli* (Tao et al., 2006).

3.2. Загальні методи створення високопродуктивного промислового штаму

Як об'єкти селекції, мікроорганізми, мають свої особливості на відміну від рослинних і тваринних організмів. Зокрема:

1. Культури можна виділяти фактично з 1 клітини, що призводить до високої генотипової однорідності культури.
2. Завдяки швидкому розмноженню мікроорганізми мають високу мінливість і швидко змінюють свій генотип.
3. Мікроорганізми зазвичай є гаплоїдними, тобто не мають прихованих в рецесивному стані ознак.
4. Мікроорганізми розмножуються вегетативним способом.
5. Мікроорганізмам властива швидка зміна поколінь.

Для отримання промислових продуцентів використовують виділення клітин з природних субстратів, експериментальне підвищення активності культури, отримання корисних форм методом гібридизації та відбір нових форм після дії мутагенів [83].

3.2.1. Використання природного та штучного добору

Відбір поділяється на природний та штучний. Природний відбір - це процес виживання тих організмів, які завдяки особливостям своїх генотипів найкраще адаптуються до навколишнього середовища та залишають найбільшу кількість потомства. Іншими словами, природний відбір - це диференційоване відтворення різних варіантів генотипів за цих умов.

Штучний відбір відрізняється від природного тим, що він здійснюється

					ПБ.БТ6201.ДП	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		46

людина на свій розсуд з метою отримання нових штамів мікроорганізмів.

Метод природного та штучного відбору полягає в тому, що потрібно отримати форму мікроорганізму, яка була б більш придатною в даному середовищі, ніж оригінальна. Для досягнення цього необхідно створити певні умови вирощування, за яких нова форма завдяки природним мутаціям витіснить оригінал із популяції.

При культивуванні в змінених умовах, до яких потрібно пристосовуватися, в процесі зміни генотипічної структури популяції відбувається "виродження культури" [84].

3.2.2. Використання індукованого мутагенезу

Індукований мутагенез класифікується на фізичні (температура, різні види випромінювання), хімічні речовини (інгібітори синтезу прекурсорів НК; алкілюючі сполуки; окислювачі; розширювачі ланцюгів ДНК; інгібітори синтезу ДНК; речовини комплексної дії) Це включає обробку культури мутантами. . Вибір мутагену визначається типом мутагенного типу, який слід отримати, і впливом мутагену на мікроорганізм.

Простим і зручним способом отримання різних типів мутантів є УФ-опромінювання. Для цього підходить будь-яке ультрафіолетове джерело з випромінюванням в короткому діапазоні довжин хвиль (близько 253,7 нм). Однак, високі частоти мутацій досягаються при низькій швидкості виживання бактерій. У разі хімічного мутагенезу дозування характеризується концентрацією мутагену в суспензії для дії та експозиції на певну температуру.

При підборі дози мутагенного впливу на виживання обробленого мікроорганізму остання визначається відношенням кількості колоній, вирощених в агарі після мутагенного впливу. Виживання залежить від дози мутагену та чутливості мікроорганізму до летальних наслідків мутагену,

Чутливість може суттєво відрізнятися у різних штамів виду. Дози, які гарантують виживання клітин у межах від 0,1 до 50-80%, використовуються для селекційної роботи [30].

					ПБ.БТ6201.ДП	Арк.
						40
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

Найвища летальність і мутагенна активність проявляються УФ-опроміненням на довжині хвилі 260 нм, де спостерігається максимальне поглинання УФ-світла ДНК. Експерименти *in vitro* показали, що пурини більш стійкі до хімічних змін, спричинених УФ-променями, а піримідини можуть змінюватися як мінімум у двох напрямках. Одна з них - гідратація, друга реакція - утворення димерів піримідину. Якщо перша реакція не є біологічно важливою, друга реакція викликає важкі порушення реплікації ДНК.

Фізичні фактори (УФ-випромінювання та різні види іонізуючого випромінювання) впливають на водні суспензії спор або клітин. При обробці хімікатами (алкілметансульфонат, алкілсульфат, алкіл нітрососечовина, метил нітрозогуанідин) слід дотримуватися умов, що сприяють максимальній експресії мутагенної активності цієї речовини. Оскільки рН розчину є дуже важливим у цьому плані, обробку проводять у буферному розчині, який є найбільш ефективним для цих мутантних значень рН. У разі хімічних мутацій дозування характеризується концентрацією мутації в суспензії та експозицією при певній температурі. Серед хімічних мутагенів добре вивчена дія азотної кислоти, яка викликає окисне дезамінацію азотистих підстав ДНК (заміна аміногруп гідроксиллом). Це порушує правила взаємодоповнення бази та замінює АТ на ГЦ [84].

Найвищий вміст β -каротину (59,91 мг / г сухої біомаси) та вироблення (2130 мг / л) були отримані при додаванні 35 мМ NaAc на стаціонарній фазі, що склало 77,7% та 80,5% приросту порівняно з контролем відповідно. Крім того, було досліджено вплив NaAc на рівні експресії генів каротиногенезу у

					ПБ.БТ6201.ДП	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		40

спареній *B. trispora*. Результати показують, що додавання NaAC у сполученому середовищі спричиняло індукцію експресії п'яти генів

каротеногенезу (*hmgR*, *carG*, *ip1*, *carRA* та *carB*) та сприяло синтезу β -каротину *de novo*. Індукція експресії п'яти генів демонструвала послідовні профілі експресії генів, а експресія п'яти генів коливалася в межах від 1,8 до 3,8-кратного збільшення вже через 24 години після додавання NaAC. Це показує, що стимуляція NaAC біосинтезу β -каротину у спорідненій *B. trispora* бере участь у зміні на рівнях транскрипції генів. Такий регуляторний механізм дає пояснення впливу NaAC на біосинтез β -каротину у спареній *B. trispora*. [63]

Це підтверджено результатом, що мРНК багатьох генів *Blakeslea* є більш рясними під час спаровування, ніж в одиночних культурах. Вплив на більшість цих генів скасовується ацетатом, доданим в невеликих кількостях, які не можуть відповідати виробленому ацетил-КоА від багатого на глюкозу середовищі. Ацетат є таким чином, ймовірно, буде діяти як сигнал із широкими ефектами на метаболізм спарених культур, а не лише виробництва каротину.

Статева регуляція гена, відповідального за фітоен-дегідрогеназу вже була відома. У спарених культурах транскрипти *carB* і *carRA*, структурних генів для каротеногенезу, більш рясні, ніж в одиночних культурах [70,71] і це збільшення гальмується ацетатом. Кількість цих транскрипцій корелює з вмістом каротину в парних та одиночних культурах і забезпечують достатню кількість пояснення для них [72].

Принаймні в *N. crassa* і *M. circinelloides*, було показано, що світло індукує збільшення транскрипції генів, що кодують ГГПФ-синтазу, яка присутня в багатьох грибів [65].

					ПБ.БТ6201.ДП	Арк.
						47
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

Відомо Дві групи речовин, здатних модифікувати цей біосинтез принаймні на його завершальних стадіях. Першою групою є дифеніламін, який гальмує утворення пігментів, блокуючи метаболічний ланцюг на рівні фітоїну.[69]. Друга Група включає йонони та деякі природні терпеноїди, які конкретно підсилюють утворення β -каротину. Зараз ми знаємо, що серія речовин, не пов'язаних хімічно один з одним, можуть також ефективно діяти на цей біосинтез. Деякі з них, як диметилформамід, сукцинімід або ізонікотіноілгідразин, дають певне збільшення загального врожаю каротиноїдів. Їх дія є адитивною до дії йононів, які можуть бути в середовищі.

Інші активні продукти належать до значно більш обмеженої групи орієнтовані на певні N-гетероциклічні основи. Вони блокують синтез

на рівні лікопену і, здається, скасовують дію йононів. Можна припустити, що вони інгібують досить конкретно дегідрогенази, необхідні для закриття кінцевого кільця β -каротину оскільки відомо, що вони діють на інші ферменти такого типу. [68]

Практично, додавання 0,5-1 г / л. Ізонікотіноілгідразину в культуральному середовищі *B.trispora*, дає вдвічі більше β -каротину, ніж зазвичай отримують, а кількість перевищує 3 г / л. можна виробляти. Іони, необхідні для цього, можуть бути заміщений 2,6,6-триметил-1-ацетилциклогексеном. За відсутності будь-якої з цих речовин -- можна отримати рясне виробництво лікопену (з порядок 1 г / л.), додаванням до культурального середовища піридину або імідазолу. Таким чином, виробництво цих двох каротиноїдних пігментів значно полегшується в результаті цієї роботи.

Розробка кофакторного модуля. НАДФ та АТР, кофактори

мевалонатного та МЕФ шляхів, є критично важливими для біосинтезу каротиноїдів. 16 молекул НАДФ, 8 молекул АТФ і 8 молекул ЦТФ потрібно для однієї молекули β -каротину, що виводиться шляхом МЕФ-шляху (Alper et al., 2005a). Для отримання ГМГР на Мевалонатному шляху необхідні два НАДФ. НАДФ в основному походить із шляху ПП та циклу ТКК (Sauer et al., 2004). З метою регенерації та збільшення кількості НАДФ, необхідного для надвиробництва каротиноїдів, для інженерії шляху ПП використовувались декілька стратегій, включаючи переекспресію глюкозо-6-фосфатдегідрогенази (Zwf1) (Zhao et al., 2015) або переекспресію транкетлази I (TktA) та Трансальдолази B (talB) (Zhao et al., 2013). Розробка циклу ТКК шляхом надмірної експресії малатдегідрогенази (Mdh) (Choi et al., 2010) або цитратної синтази (GltA), бета-кетоглутаратдегідрогенази (SucAB) та сукцинатдегідрогенази (SdhABCD) (Zhao et al., 2013) також покращують постачання НАД (Ф) Н та вироблення каротиноїдів. Крім того, активація продукції НАДФ шляхом оптимізованої експресії фактора транскрипції Stb5, який може регулювати гени в пентозофосфатному шляху, збільшила продукцію лікопена на 14% (Hong et al., 2019). Аналогічно, переекспресія мітохондріальної кінази НАД-Н (Pos5), яка перетворює НАД-Н в НАДФ, збільшувала як вироблення лікопена, так і β -каротину (Zhao et al., 2015). Для збалансування НАДФ, обмеження споживання за ціллю, такого як вибиття гена, що кодує глутаматдегідрогеназу (GdhA) (Alper et al., 2005a; Choi et al., 2010) або несуттєву альдегіду редуктазу YjgB, залежної від НАДФ. та ін., (2017a) для збільшення накопичення НАДФ також можна застосувати для збільшення вироблення каротиноїдів.

Перевиробництво каротиноїдів, що є вторинними метаболітами, може збільшити метаболічне навантаження хазяїна і, таким чином, знизити ріст

					ПБ.БТ6201.ДП	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		49

клітин, що може бути полегшене за рахунок динамічного управління модулями для розділення клітинних процесів на фазі росту, де досягається висока щільність клітин, і фази виробництва яка зосереджена на надвиробництві каротиноїдів. Для отримання високої щільності клітин використовували вільну від індукторів/ репресорів послідовну стратегію контролю, яка пригнічувала біосинтез каротиноїдів під час фази росту за допомогою промотору глюкозорепресії. Після споживання глюкози під час фази росту активізувався каротиноїдний синтез і можна було досягти надвиробництва каротиноїдів без шкоди для клітинної щільності, що призводило до 1156 мг/л β -каротину в біореакторі (Xie et al., 2015b).

3.2.3. Використання гібридизації для створення промислових продуцентів біологічно-активних речовин

Гібридизація або генетична рекомбінація - це перерозподіл генів, що дозволяє об'єднати властивості двох або більше організмів в один гібридний геном. Рекомбінація відбувається кількома способами обміну генетичною інформацією.

- статеві та напівсполучні процеси еукаріотичних мікроорганізмів (дріжджів та грибів);
- кон'югація, перетворення та трансдукція в прокаріоти;
- Злиття протопластів.

Основна перевага цього методу - можливість комбінування

В одному геномі відрізняються мутації від інших батьківських штамів без застосування додаткового лікування мутагенезом і не знаходження потрібної мутації в первинному штамі. З 1950-х років робляться спроби отримати гібридні штами у виробників антибіотиків та вітамінів (актиноміцети та гриби), але генетичні рекомбінанти широко не використовуються при відборі виробників біологічно активних речовин.

Трансформація- Варіант передачі генетичної інформації. З Клітини донора виходять ДНК і надходить до реципієнта.

					ПБ.БТ6201.ДП	Арк.
						50
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

Спочатку ДНК адсорбується на Поверхня клітини і Поглинається. Продовжується фаза відбору хромосомної ДНК та хромосоми реципієнта та процес після комбінації. Кількість ДНК— приблизно 10 т.п.н. інформації, яку можна передавати.

Трансформація – це не тільки процес який проходить при *in vitro*, вона може проходити і за рахунок ДНК, що спонтанно виділяється із клітини без участі експериментатора. Вихід ДНК із клітини, обумовлено головним чином автолізом і при природній трансформації бактерія-донор ДНК обов'язково гине. Природна трансформація являється одним із способів горизонтального переносу генів в природних умовах [85].

Трансдукція - це передача генетичної інформації (хромосомні гени або плазміди) від клітин-донорів, що містять бактеріофаг, до клітин-реципієнтів. Під час трансдукції хромосомні або плазмідні фрагменти повинні бути упаковані в головку бактеріофага; Відхід у складі цих частинок із клітин-донорів внаслідок лізису та потрапляння до інших клітин у новій інфекційній поведінці. Білкова капсида фагової головки захищає ДНК від руйнування нуклеазами. У зв'язку з цим трансдукція ДНК під час трансдукції є більш захищеною, ніж ДНК. Недоліком цього механізму є те, що передача інформації може відбуватися лише між бактеріями відповідного виду.

При трансдукції розмір інформації про доставку визначається розміром головки бактеріофага. Різні фаги можуть нести від 20 до 40 т.п.н. інформації. Таким чином, як окремі гени, так і спеціальні маркери доставляються під час трансформації.

Кон'югація - це обмін генами, що включає передачу генетичної інформації від клітин-донорів до клітин-реципієнтів шляхом прямого контакту. Під час кон'югації відбувається передача генетичного матеріалу за допомогою плазміди кон'югації. Процес передачі хромосомних генів під час кон'югації також може відбуватися за участю транспозонів кон'югації, розташованих на хромосомі.

					ПБ.БТ6201.ДП	Арк.
						51
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

Найбільш ефективний механізм горизонтального перенесення генів у всіх середовищах проживання бактерій. Перевага цього механізму полягає в тому, що систематично віддалені мікроби можуть кон'югуватися. Кількість ДНК, що доставляється під час кон'югації, більша, ніж під час трансформації та трансдукції. Вся хромосома може бути перенесена в слабких умовах спаровування [85].

Загальні риси всіх методів обміну генетичною інформацією про бактерії:

1. Процес передачі ДНК завжди є одностороннім або однонаправленим, від бактерій-донорів до отримувачів.
2. Повний обмін генетичною інформацією не спостерігається, тому утворюється мезозот.
3. Для утворення рекомбінантного потомства процес перенесення гена повинен закінчуватися рекомбінацією.

Окрім трьох основних методів обміну генетичною інформацією, існують методи, які ще недостатньо вивчені та успішно використовуються в лабораторній практиці.

Одним із таких методів обміну є злиття бактеріальних протопластів або глобулярних клітин. Це штучний обмін так званою генетичною інформацією, оскільки він не містить неушкоджених клітин та протопластів. Складність цього методу полягає в тому, що дослідник повинен спочатку отримати протопласти з обох клітин волосся, а потім обробити їх поліетиленгліколем або іншими агентами для змішування та індукції синтезу. Основним продуктом цього злиття є клітини, що інтегрують геноми обох батьків. Комбіновані протопласти розпорошуються на спеціальному середовищі, створюючи умови, які можуть бути регенеровані в морфологічно повноцінні клітини. В процесі рекомбінації виникають стабільні рекомбінантні клітини, що суміщають властивості обох батьківських штамів [83].

					ПБ.БТ6201.ДП	Арк.
						52
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

Дуже новим і сучасним способом отримання виробників із заданими характеристиками є генна інженерія.

Суть генної інженерії зводиться до навмисного побудови генетичної системи поза організмом і потім впровадження її в живий організм. У цьому випадку рекомбінантна ДНК стає частиною генетичного пристрою приймаючого організму, а також надає нові корисні для людини генетичні, фізіологічні та біохімічні властивості. Основними інструментами генної інженерії для об'єднання, синтезу, виявлення та аналізу генів є:

- ферменти, які діють на ДНК;
- Вектор (система доставки генів);

• Штучні олігонуклеотиди (лінкери, адаптери, праймери, промотори, зонди). Потрібно зазначити, що традиційні методи створення вихідного матеріалу (штучний мутагенез, гібридизація) обмежені рамками певного виду або близьких у видовому відношенні форм. Генетична інженерія поєднала генетичні детермінанти різних джерел, включаючи представників видів, дуже віддалених до одного геному, створюючи можливість синтезу організмів у нові організми, які не є спадковими, із поєднанням генетичних властивостей.

Методи генетичної інженерії отримують рекомбінантну ДНК з геномних фрагментів різних організмів, копіюють такі штучні молекули, використовують вектори (плазмідні або вірусні ДНК) для введення їх у клітини, а клітини цих іноземних введених, часто повністю чужих генів Це дає змогу генерувати умови вираження при. Тому в цьому випадку маніпуляції проводяться на рівні молекули ДНК.

Ці методи не часто використовуються для отримання сильних продукторів каротину через їх високу матеріальну вартість, час та складність.

					ПБ.БТ6201.ДП	Арк.
						53
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

3.3 Схема отримання продуценту, що використовується в роботі

Штами.

1. *B. trispora* K2 (-) дикий штам (депонований в депозитарії Інституту мікробіології та вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України).

2. *B. trispora* K2 (+) дикий штам (ІМВ НАН України).

1. Підготовка культурального середовища

Всі розчини та носії готуються з дистильованою водою. Описані тут культуральні середовища були розроблені спочатку для штамів *P. blakesleeanus* і добре працюють для *B. trispora*.

1. Мінімальний агар: готується два окремих розчини.

Розчин А: 20 гр D -глюкоза та 15 г агару в 500 мл дистильованої води.

Розчин В: 2 г L -парапарагіну Н₂О, 5 г КН₂РО₄, 0,5 мг MgSO₄ · 7Н₂О,

і 20 мл основного розчину мікроелементів в 500 мл води.

Автоклавуйте окремо при надлишковому тиску 100 кПа (близько 1 атм)

20 хв, добре перемішайте і використовуйте.

2. Мінімальний агар, кислота: Мінімальний агар закислений до рН 3,4 за допомогою НСІ після автоклавування та перемішування розчину А та розчину В.

3. Основний розчин мікроелементів (50 ×): 2,8 г / л СаСІ₂, 0,05 г / L-тіамін НСІ, 0,1 г / л лимонної кислоти Н₂О, 75 мг / л Fe (NO₃)₃ · 9Н₂О, 50 мг / л ZnSO₄ · 7Н₂О, 15 мг / л MnSO₄ · Н₂О, 2,5 мг / л CuSO₄ · 5Н₂О і 2,5 мг / л Na₂МоО₄ · 2Н₂О в воді. Для тривалого зберігання при кімнатній температурі додайте кілька крапель хлороформу.

4. Багатий агар: Мінімальний агар з додатковим 1 г дріжджового екстракту в розчині А.

5. Багатий агар, кислота: багатий агар закислений до рН 3,4 за допомогою НСІ після автоклавування та змішування розчину А та розчину В

6. Картопле-декстрозний агар: відваріть 200 г свіжої, очищеної і нарізаної кубиками картоплі у 1,5 л води протягом 1 год. Проціджують і додають до екстракту 20 гр D -глюкоза, 1 мг тіаміну.НСІ і 15 г агару. Доведіть об'єм до 1 л з дистильованою водою і автоклавом. Крім того, комерційний, зневоднений агаровий декстрозний агар може бути використаний (іноді з поганими результатами).

2. Різне

1. Основний розчин N-метил-N' -нітро- N-нітрозогуанідину (МННГ):

					ПБ.БТ6201.ДП	Арк.
						54
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

Він готується під витяжкою. Налийте невелику кількість МННГ (кілька міліграмів) в попередньо зважену пробірку. Знову зважте пробірку і доведіть концентрацію до 1 мг / мл з водою. Щільно закрийте пробірку і струсіть щоб прискорити розчин. Помістити аліквоти приблизно 0,2 мл в стерильні пробірки Еппендорфа (ємність 1,5 мл) і зберігати замороженими в темряві до використання. Розчин жовтий і знебарвлюється, якщо сполука інактивована; поглинання 1 мг / мл розчину при 400 нм через 1-сантиметровий світловий шлях дорівнює 1,1. Аликвоти розмороженого розчину не повинні використовуватись повторно .

2. Розчин тіосульфату натрію: 20 г / л $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$.

3. Розчин Твін-80: 1 мл / л поліоксиетиленового сорбітану моноолеат у воді, стерилізований в автоклаві.

3. Споривий урожай

1. Збирайте спори зі споруваних культур (через 4–5 днів після інкубації на мінімальному агарі при 30 ° C) обережним промиванням міцелійної поверхні стерильним розчином Твін-80.

2. Отриману суспензію спор центрифугуйте 2000 × g (або більше) протягом 1 хв.

3. Промивають спорову пелету двічі стерильним розчином Твін-80 і ресуспендують у стерильному розчині Твін-80.

4. Збереження штаму

1. Споріві суспензії в розчині Твін-80 втрачають життєздатність при температурі 4 ° C за кілька днів. Для тривалого збереження при -20 ° C, стерильний гліцерин додають до фінальної концентрації 200 мл / л.

2. Штам штамів зберігається як ліофіли. Стерилізують ліофільні пробірки після розміщення в них невеликого шматочка паперу, з назвою штаму, та бавовняної пробки. Суспендувати спори в стерильний білковий розчин (наприклад, сироватка крові, розчин альбуміну сироватки, або нежирне молоко, відтворене з порошку), покласти 0,5 мл в кожну пробірку і дотримуйтесь вказівок ліофілізатора, щоб заморозити їх (при температурі близько -50 ° C), висушити (при кількох Па) і закрити з паяльником. Записати ім'я штаму у зовнішні наліпки та зберігати колекцію у холодному приміщенні або при кімнатній температурі.

5. Культивування штаму

1. Розкладіть 10^4 спор на пластинах з мінімальним агаром і інкубуйте в темноті протягом 4 днів . Рекомендована температура для росту - 30 ° C, а

					ПБ.БТ6201.ДП	Арк.
						55
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

для спороношення - 23 ° С; генетичні процедури може здійснюватися задовільно при звичайній кімнатній температурі.

6. Мутагенез

1. Підготувати стаканчик (500 мл) з 200 мл розчину тіосульфату натрію.
2. Центрифугуйте протягом 1 хв при $2\,000 \times g$ (або більше) двох аликвот суспензії спор, кожна з яких має 5×10^6 життєздатних спор / мл, що нещодавно зібрали. Ресуспендують пелети в 0,95 мл Твін-80 розчину в стерильних пробірках Еппендорфа (2 мл). Відібрати 50 мкг від кожної пробірки до пробірки для розведення, з розчином Твін-80, для розрахунку життєздатних спор на мінімальному агарі.

3. Додайте 0,1 мл розчину Твін-80 в одну з пробірок і 0,1 мл Розчину МННГ до іншої та інкубують їх протягом 30 хв при 30 ° С у темряві при дуже м'якому струшуванні. Фінальна концентрація МННГ становитиме 0,1 г / л. Забруднений наконечник мікропіпетки розмішують у розчині тіосульфату.

4. Після завершення інкубації відберіть 50 мкл з кожної пробірки для розрахунку життєздатних спор, і центрифугуйте решту протягом 1 хв.

Позбавтеся від контрольної пробірки.

5. Проціджують супернатант у розчині тіосульфату натрію .

6. Повторно суспендують пелети спор в 1 мл розчину Твін-80, струшують

добре і центрифугують знову.

7. Ресуспендують гранули спор в 1 мл розчину Твін-80, струшують добре і розкладіть аликвоти 50 мкл L на планшетах з агаром багатим кислотою.

8. Інкубуйте пластини в темряві при 30 ° С протягом 4–8 днів .

7. Скринінг та очищення мутантів

1. Визначте передбачувані мутантні колонії та субкультуруйте (пересійте) їх окремо на кислотному агарі при 30 ° С у темряві. Прищепка може бути фрагмент міцелію, вирізаний кінчиками ниткових пінцетів або спори, передані стерильними зубочистками. Зробіть те ж саме з деякими колоніями дикого типу в якості контролю.

2. Вирощуйте колонії з кожного передбачуваного мутанта шляхом поширення спори на кислотному агарі для отримання окремих колоній.

3. Перевірити фенотип та субкультуру хоча б ще раз. Якщо колонії не є однорідними, субкультувати до тих пір, поки всі колонії не будуть однаковими в морфології, зростанні та кольорі.

4. Збирайте спори і зберігайте в колекції під постійними ідентифікаційними номерами і генотипом.

					ПБ.БТ6201.ДП	Арк.
						56
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

8. Побудова міжстатевих гетерокаріонів

1. Інокують міцеліальні фрагменти двох штамів протилежної статі на протилежних сторонах картопляно-декстрозних агарових пластин.
2. Інкують пластинки в темряві до появи яскраво-жовтих смуг по лінії, де зустрічаються міцелії.
3. Перенесіть міцеліальні фрагменти від яскраво-жовтих смуг на Мінімальний агар .
4. Після інкубації в темряві перевірте, чи немає частин міжстатевого міцелія .
5. Субкультують міцеліальні фрагменти цього міжстатевого міцелію на
пластинах мінімального агару і шукають відносно рівномірний яскравий колір і оксамитовий вигляд.
6. Зберігайте міжстатевий гетерокаріотичний міцелій в колекції.

9. Сегрегація та очищення міжстатевих гетерокаріонів

1. Помістіть невеликі фрагменти міжстатевого міцелію в стерильну Пробірку Еппендорфа з 0,2 мл стерильного 0,55 М розчину сорбіту і приблизно 20–25 мг стерильного морського піску.
2. Енергійно струшуйте пробірку у вихровий міксер. Тричі струсити по 20 с і тримати пробірку в льоду протягом 10 с між ними . Перевірити гіфальне руйнування під мікроскопом і при необхідності повторити.
3. Розведіть приблизно 40 мкл струшеної суспензії на пластинках мінімального кислотного агару та інкують їх близько 4 днів у темряві.
4. Колонії, що утворюються, неоднорідні, від гомокаріонів до гетерокаріонів з різними пропорціями складових штамів. Вибирайте та зберігайте окремі колонії, що цікавлять вас.
5. При необхідності пересійте міцеліальні фрагменти міжстатевого міцелію до тих пір, поки вони не стануть однорідними за кольором і зберігають їх в колекції.

Схема отримання штамів:

1. Підготовка культурального середовища
 1. Мінімальний агар: готується два окремих розчини.
 2. Мінімальний агар, кислота: Мінімальний агар закислений
 3. Основний розчин мікроелементів
 4. Багатий агар,
 5. Багатий агар, кислота: багатий агар закислений
 6. Картопле-декстрозний агар

					ПБ.БТ6201.ДП	Арк.
						57
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

2. Різні

1. Основний розчин N-метил-N' -нітро- N-нітрозогуанідину (МННГ)

2. Розчин тіосульфату натрію

3. Розчин Твін-80

3. Споривий урожай

1. Збирайте спори зі споруваних культур

2. Отриману суспензію спор центрифугуйте

3. Промивають спорову пелету розчином Твін-80

4. Збереження штаму

1.стерильний гліцерин додають до фінальної концентрації 200 мл/л.

2. Штам штамів зберігається як ліофіли.

5. Культивування штаму

1. Розкладіть 10^4 спор на пластинах з мінімальним агаром і інкубуйте в темноті протягом 4 днів .

6. Мутагенез

1. Підготувати стаканчик (500 мл) з 200 мл розчину тіосульфату натрію.

2. Центрифугуйте протягом 1 хв

3. Додайте 0,1 мл розчину Твін-80 в одну з пробірок і 0,1 мл Розчину МННГ до іншої

4.відберіть 50 мкл для розрахунку життєздатних спор

5. Проциджують супернатант

6. Повторно суспендують пелети спор в 1 мл розчину Твін-80

7. Ресуспендують гранули спор в 1 мл розчину Твін-80

8. Інкубуйте пластини в темряві при 30 ° С протягом 4–8 днів .

7.Скринінг та очищення мутантів

1. Визначте передбачувані мутантні колонії та субкультуруйте

2. Вирощуйте колонії з кожного передбачуваного мутанта

3. Перевірити фенотип

4. Збирайте спори і зберігайте в колекції

8. Побудова міжстатевих гетерокаріонів

1. Інокують міцеліальні фрагменти штамів протилежної статі

2. Інкубуйте пластинки в темряві до появи яскраво-жовтих смуг

3. Перенесіть міцеліальні фрагменти на Мінімальний агар .

4. перевірте, чи немає частин міжстатевого міцелія .

5. Субкультують міцеліальні фрагменти цього міжстатевого міцелію на

пластинах мінімального агару

6. Зберігайте міжстатевий гетерокаріотичний міцелій в колекції.

					ПБ.БТ6201.ДП	Арк.
						58
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

9. Сегрегація та очищення міжстатевих гетерокаріонів

1. Помістіть невеликі фрагменти міжстатевого міцелію з 0,2 мл розчину сорбіту і морського піску.
2. Енергійно струшуйте пробірку у вихровий міксер. Перевірити гіфальне руйнування
3. Розведіть приблизно 40 мкл струшеної суспензії на пластинах мінімального кислотного агару та інкубують.
4. Вибирайте та зберігайте окремі колонії, що цікавлять вас.
5. При необхідності пересійте міцеліальні фрагменти міжстатевого міцелію

3.4 Особливості технології або апаратурного оформлення у зв'язку з використанням обраного продуцента

У виробництві бетакаротину основною складністю є використання етилацетату та етанолу для екстракції готового продукту, а також подальше очищення відходів від цих розчинників.

Етилацетат (етиловий ефір оцтової кислоти) $\text{CH}_3\text{-COO-CH}_2\text{-CH}_3$ - безбарвна летюча рідина з різким запахом ефіру. Молярна маса 88,11 г/моль, температура плавлення $-83,6^\circ\text{C}$, температура кипіння $77,1^\circ\text{C}$, густина 0,9001 г/см³. Розчиняється в воді 12% (по масі), в етанолі, діетиловому ефірі, бензолі, хлороформі.

Етанол – одноатомний спирт складу $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, За звичайних умов є безбарвною, легкозаймистою рідиною. Молярна маса 46,068 г/моль, $T_{\text{плавлення}} - 114,14^\circ\text{C}$, температура кипіння $78,29^\circ\text{C}$, густина 0,7893 г/см³.

Змішується в будь-яких пропорціях з водою, естерами, ацетоном, бенzenом. Етиловий спирт є гарним розчинником для багатьох органічних, а також неорганічних речовин.

Основним елементом хімічного очищення вилучення каротину є регенерація відпрацьованого органічного розчинника. Його здійснюють лужною обробкою, паровою перегонкою розчинника та дистиляцією.

					ПБ.БТ6201.ДП	Арк.
						59
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

Слід підкреслити, що органічні розчинники - це легкозаймисті вибухові речовини. Пари розчинників, що потрапляють в атмосферу магазину, згубно впливають на здоров'я обслуговуючого персоналу.

З цієї причини для використання способу витяжки необхідно використовувати ретельно герметичне технологічне обладнання, оснащене вибухозахищеними електродвигунами, антистатичними пристроями, брандмауерами повітряних трубопроводів. Виробничі приміщення повинні бути забезпечені сильною механічною вентиляцією постійного струму, подачею протипожежної рідини, спеціальними засобами протипожежного та санітарно-гігієнічного обладнання.

Технологічною особливістю виробництва каротиноїдів є також велика кількість відходів (міцелій, шлами). Значна кількість циркулюючої води, розчинників та реагентів утворює велику кількість стічних вод. У деяких випадках використання відходів вимагає попередньої обробки, а скидання або використання стічних вод вимагає попередньої хімічної та бактеріальної обробки.

					ПБ.БТ6201.ДП	Арк.
						60
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

4. ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА

4.1 Характеристика кінцевої продукції виробництва

Назва продукції: β -каротин.

Міжнародна назва продукції: β -carotene.

Призначення продукції та можливі галузі використання:

- Харчова промисловість. Додається в кондитерські, хлібопекарські молочні вироби для стабілізації та покращення органолептичних показників.
- Фармакологічна промисловість. Безпечний барвник для ліків. Може бути додатково очищений або простерилізований, оскільки отриманий за даною технологією препарат не є стерильним. При додаванні допоміжних речовин, розчиненні у маслі або створенні вододисперсних форм, можна створити лікарський препарат у капсулах, для перорального введення, що володіє широким спектром захисної та відновлювальної дії і може використовуватися для багатьох дерматологічних захворювань та недостачах.
- Наукові дослідження. Препарат потребує подальших досліджень, основні напрямки яких – визначення повного спектру протипухлинної, антиоксидантної дії, проведення клінічних досліджень.

Характеристика продукції:

- очистка препарату 95%;
- вологість 5%;

Зовнішній вигляд продукції: нестерильний кристалічний порошок бурого-червоного кольору, нерозчинний у воді та погано розчинний у етанолі.

Форма випуску: скляні банки об'ємом 1000 мл по 1 кг порошку у кожний. Флакони виготовляють із скломаси. Метод укупорювання –

					ПБ.БТ6201.ДП		
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат	РОЗДІЛ 4. ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА		
Розробив	Бездрабко А.Д.						
Консульт.							
	Литвинов						
					Стадія	Аркуш	Аркушів
					Д	61	122
					КПІ ім. І. Сікорського. ФБТ		

резинова пробка.

Упаковка: банки партіями по 10шт. розфасовані по картонним упаковкам.

Маркування пакувальних матеріалів, нанесене печаткою або тисненням, повинне бути чітким, стійким до дії світла (вигорання) і видалення [86]. Кожна пакувальна одиниця споживчої та групової тари повинна мати етикетку з паперу етикетного (ГОСТ 7625-86) або паперу письмового (ГОСТ 18510-87), виготовлену поліграфічним способом друку (ТУ У 21521832.001) або тисненням із зазначенням наступних позначень:

- товарний знак і назва підприємства-виробника, його адреса і місце виготовлення;
- назва продукту;
- дата виготовлення;
- умови зберігання;
- термін придатності до споживання;
- маса нетто порошку (в г);
- кількість пакувальних одиниць (для групової тари);
- позначення технічних умов.

Кінцевий транспортний засіб перевозиться в герметичних транспортних засобах і контейнерах (ГОСТ 20435) усіма видами транспорту відповідно до транспортних правил, що застосовуються до відповідних засобів транспорту, та додаткових вимог, зазначених у документації на кінцевий товар. Транспортна індикація виконується з експлуатаційною індикацією "Захищайте від вологи!" і назва.

Біологічно активна добавка β -каротин зберігається в сухому, добре провітрюваному складі при температурі нижче + 25 $^{\circ}$ C і відносній вологості повітря

нижче 75%.

					ПБ.БТ6201.ДП	Арк.
						62
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

4.2. Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів, що використовуються у виробництві

Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів, що використовуються при виробництві β -каротину наведена в таблиці 4.1.

Таблиця 4.1. Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів

Найменування	Категорія і номер НТД, згідно якої перевіряються показники якості	Показники, що обов'язкові для перевірки та їх нормативне значення	Примітки
1	2	3	4
1. Основна сировина			
1.1. Агар Сусловий	ГОСТ Р 56145-2014	Масова частка золи (в перерахунку на суху речовину) не менше 2%; не допускається присутність йоду і важких металів	Компонент ПС для відновлення музейної культури

1.2. Борошно соєве	ДСТУ 4543:2006.	Вологість не більше 9%, інші показники згідно ДСТУ	Компонент поживного середовища
1.3. Борошно кукурудзяне	ГОСТ 14176-69	Вологість не більше 15%, інші показники згідно ГОСТ	Компонент поживного середовища
1.4. Етилацетат	ГОСТ 8981- 78	Масова частка етилацетату не менше 99%	Екстрагент
1.5. Калій фосфорнокислий однозамісний	ГОСТ 4198- 75	Масова частка калію фосфорнокислого не менше 99,5%	Компонент поживного середовища
1.6. М'ясо	ДСТУ 3696- 98	Усі показники згідно вимогам ДСТУ	Компонент поживного середовища
1.7. Олія соняшникова	ДСТУ 4492:2017	Масова частка нежирових домішок, не більше ніж 0,01%	Компонент поживного середовища
1.8. Патока крохмальна	ГОСТ 33917-2016	Масова частка сухої речовини не менше 78%;	Компонент поживного середовища

2. Допоміжна сировина

2.1. Вода питна	ГОСТ 2874-82	pH 6,0-9,0; хлориди - не більше 350 мг/дм ³ ; жорсткість загальна -не більше 7 моль/дм ³	Холодо- і теплоагент; для мийки і ополіскування обладнання, приготування поживних середовищ
1	2	3	4
2.2. Засіб миючий синтетичний порошкоподібний	ГОСТ 25644-96	Вміст активного хлору 4,86%	Для мийки обладнання та приміщень
2.3. Кислота соляна	ГОСТ 3118-77	Масова частка соляної кислоти не менше 35-38%	Для регулювання кислотності культуральної рідини
2.4. Натр їдкий технічний	ГОСТ 2263-79	Масова частка гідроксиду натрію не менше 42%	Для регулювання кислотності, нейтралізації стічних вод та етилацетату

2.5. Перекис водню	ГОСТ 177-88	Масова частка перекису 30%-40%	Для дезинфекції обладнання та приміщень
--------------------	-------------	--------------------------------	---

1	2	3	4
1.9. Спирт етиловий	ДСТУ 4221:2003	Об'ємна частка етилового спирту не менше 96,3%	Екстрагент
1.10. Тіаміну хлорид	ГОСТ Р 53494-2009	Вологість не більше 10%, інші показники згідно ГОСТ	Компонент поживного середовища
1.11. Шрот кукурудзяний	ГОСТ 11049-64	Вологість не більше 9%, інші показники згідно ГОСТ	Компонент поживного середовища
1.12. Штам В.Trispora K2 (+) та K2 (-).		Морфологія, характерна для даного продуценту, без присутності сторонньої мікрофлори	Посівний матеріал

3. Матеріали

3.1. Гумові пробки	ТУ У 6001 52253.013 -96	Маркування, цілісність	Пакування готової продукції
3.2. Картонні коробки	ГОСТ 12301-2006	Маркування, цілісність	Вторинна упаковка по 10 флаконів

3.3. Тканина фільтрувальна	ГОСТ 50534-93	Усі показники у відповідності з ГОСТ	Підготовка повітря
3.4. Флакони скляні	ТУ 9461 023- 00480678- 99	Маркування, цілісність, відсутність сторонніх включень	Пакування готової продукції

Продовження таблиці 4.1

1	2	3	4
4.Напівпродукти			
4.1. Посівний матеріал	Згідно виробничого регламенту	Мікробіологічн а чистота	Для засіву ферментера

4.3. Опис технологічного процесу

Технологія виробництва β -каротину складається із наступних принципових стадій: підготовка посівного матеріалу; підготовка поживного середовища, виробничий біосинтез; виділення та очистка β -каротину. Докладніше дані процеси представлені у графічній частині дипломної роботи на технологічній схемі виробництва β -каротину шляхом мікробного синтезу культурою *B. Trispora* штами K2 (+) та K2 (-). Апаратурне оформлення процесів представлено у графічній частині дипломної роботи на апаратурній схемі виробництва β -каротину.

ДР 1. Санітарна підготовка виробництва.

Підготовка виробництв - це робочий і підготовчий блок, що забезпечує препарати регульованої якості на всіх наступних етапах виробництва. Ці

					ПБ.БТ6201.ДП	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		67

етапи включають навчання персоналу, підготовку розчинів для очищення та дезінфекції, підготовку виробничих приміщень, обладнання та комунікацій, підготовку робочих розчинів та підготовку повітря та води. Санітарна підготовка виробничих та технічних процесів здійснюється відповідно до вимог GMP, ДСанПІН та чинних стандартів у галузі фармацевтики та біотехнології. [86].

ДР 1.1. Підготовка персоналу

Навчання персоналу включає інструктаж з безпеки та навчання здоров'я.

Належну гігієну працівників забезпечують охорона здоров'я зайнятості, регулярні перевірки стану здоров'я не рідше одного разу на рік (проводяться відповідними розпорядженнями Міністерства охорони здоров'я України) або регулярні медичні огляди осіб, які виявляють хронічні захворювання, якщо це необхідно, та особисті правила Це можливо. гігієна.

Незалежно від характеру роботи, досвіду, кваліфікації та досвіду роботи, всі працівники біотехнологічної галузі проходять навчання з безпеки. Перед початком роботи співробітники проходять навчання, навчання та регулярну перепідготовку в процесі. Однією з найважливіших вимог до працівників є належний рівень кваліфікації. Навчання персоналу включає набуття навичок, необхідних для забезпечення відповідного рівня, а також знань, щодо відповідних етапів

виробничого процесу. Весь персонал повинен регулярно проходити професійне навчання з дисциплін, пов'язаних з належною виробничою практикою виробництва продукції.

Дотримання вказаних вимог знижує вірогідність випуску бракованої продукції і створення аварійних ситуацій в результаті неправильних дій персоналу [86].

ДР 1.2. Підготовка дезінфікуючих та миючих розчинів

Відповідно до вимог GMP, персонал та обладнання повинні бути належним чином оброблені дезінфікуючими засобами, знижуючи ризик зараження цільового продукту (отримання несправного продукту).

Приготування дезінфікуючих розчинів для обробки пристроїв та будівель здійснюється відповідно до «Методичних рекомендацій щодо приготування і застосування робочих розчинів мийних, дезінфекційних, мийно-дезінфекційних засобів та антисептиків» затверджених Наказом МОЗ України від 14 грудня 2001 р. № 502.

Приготування антисептичних розчинів проводиться відповідно до правил особистої безпеки: надягайте гумові рукавички, окуляри, марлеві пов'язки.

Після підготовки дезінфікуючий розчин слід зберігати обмежений час у спеціальній ємності для попереднього миття, яку можна взяти для відбору проб для підтвердження мікробіологічної чистоти [86].

Для обробки виробничих приміщень, обладнання та комунікацій готують такі розчини: розчин перекису водню та миючий розчин порошку синтетичного порошку.

ДР 1.2.1. Підготовка розчину перекису водню

					ПБ.БТ6201.ДП	Арк.
						69
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

Розчин готують шляхом розведення 33% розчину перекису водню у збірній воді з питною водою за допомогою перемішувального пристрою для утворення 6% перекису водню при 40 об / хв, а потім зберігання дезінфікуючого розчину в конкретному контейнері (спеціальному контейнері) протягом певного часу. У цьому виробництві 6% розчин перекису водню використовується разом з миючим розчином для обробки промислових будівель та обладнання.

ДР 1.2.2. Підготовка розчину миючого засобу

Розчин роблять одноразовим у збірнику з перемішуючим пристроєм, розчиняючи певну кількість синтетичного порошкового миючого засобу у питній воді при температурі 40-50 ° С та перемішуванні при 40 об / хв. Отриманий очисний розчин використовується при обробці виробничих приміщень та агрегатів для очищення обладнання.

ДР 1.3. Підготовка виробничих приміщень, обладнання та комунікацій

Підготовку виробничих приміщень здійснюють відповідно до «Методичних рекомендацій щодо підготовки виробничих приміщень» затверджених Наказом МОЗ України від 14 грудня 2001 р. № 502, так як даний документ містить рекомендації щодо виробництва активних фармацевтичних інгредієнтів.

Виробничі приміщення, зовнішня поверхня пристрою та обробка зв'язку обробляється миючим розчином, а потім дезінфікуючим та чистим водою. Відходи рідкої та промивної води потрапляють у стадію очищення відходів Щоб запобігти появі стійких форм мікроорганізмів, дезінфікуючий розчин слід періодично замінювати. На цьому етапі пил в приміщенні контролюється і

					ПБ.БТ6201.ДП	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		70

концентрація мікроорганізмів у повітрі виробничих приміщень.

Підготовка виробничих приміщень включає прибирання виробничого приміщення, яке щодня поділяється на загальні частини. Щоденне прибирання зазвичай проводиться раз на тиждень після кожної зміни (як правило, двічі на день).

Підготовка обладнання та комунікацій здійснюється до і після технологічного процесу. Ці робочі блоки включають очищення, обробку обладнання дезінфікуючими засобами та зв'язок із подальшим очищенням. Ви також повинні перевірити протікання та справність та по можливості стерилізувати обладнання. Очищення обладнання входить у робочий блок обладнання по догляду за обладнанням і регулюється відповідно до технології, встановленої компанією відповідно до діючих технічних рекомендацій та діючих інструкцій з експлуатації обладнання.

ДР 1.3.1. Мийка вузлів обладнання

Обладнання мийть теплим розчином синтетичного миючого засобу (температура 40°C). В якості матеріалів для підготовки обладнання використовують поролонові губки, серветки із зачепленими краями з безворсової тканини. Знімальні частини (вузли) обладнання, які безпосередньо торкаються з сировиною або її проміжними продуктами, знімають, розбирають і мийть розчинами миючих засобів та водою питною за тієї ж температури. Ополіскування обладнання проводиться водою питною з обов'язковим візуальним контролем якості відмивки. Відпрацьовані розчини та промивні води надходять до стадії знешкодження відходів.

ДР 1.3.2. Дезинфекція обладнання.

Повну дезинфекцію обладнання і комунікацій проводять 1-2 рази в рік

					ПБ.БТ6201.ДП	Арк.
						71
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

розчином розчином перекису водню 6% або іншим дозволеним антисептиком. Для дезінфекції обладнання його повністю заповнюють дезінфікуючим розчином і витримують при температурі 55-65°C протягом 1,5-3,0 годин. Знімні частини обладнання зберігаються в дезінфікуючому розчині в умовах, аналогічних дезінфекції обладнання. Дезінфекція зв'язку здійснюється шляхом віджимання консервантів від одного пристрою до іншого. Після обробки консервантами обладнання та комунікації кілька разів промивають питною водою та контролюють якість промивної води. Відходи рідкої та промивної води потрапляють у стадію очищення відходів Обробка зовнішньої поверхні обладнання проводиться аналогічно підготовці виробничих приміщень.

Щоденна дезінфекція обладнання проводиться шляхом обробки зовнішньої поверхні обладнання та візуального контролю якості обробки для зв'язку з дезінфікуючими розчинами перекису водню та питною водою.

ДР 1.3.3. Стерилізація обладнання.

Термічна стерилізація має першорядне значення для обладнання для стерилізації. Взагалі слід використовувати вологу термообробку водою і парою. Ця обробка має більший ефект, ніж нагрівання сушильної установки. Частіше застосовується стерилізація перегрітою парою, що надходить у пристрій безпосередньо при тиску. Швидкість та ефективність знищення мікробної зброї зростає зі збільшенням температури.

Процес стерилізації обладнання та пристроїв обладнання здійснюється гарячою парою під тиском 0,2 МПа протягом 1 години при температурі 140 МПа, якщо інше не визначено для конкретного пристрою. Після цього перевіряють герметичність пристрою, щоб створити надлишковий тиск 0,25 МПа і спостерігати за показаннями манометра протягом 30 хвилин. Вони повинні бути

					ПБ.БТ6201.ДП	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		72

сталими.

ДР 2. Підготовка повітря.

ДР 2.1. Підготовка вентиляційного повітря.

Промислове повітря є потенційним забруднювачем, тому очищення - одне з головних питань технічної гігієни. Це досягається за допомогою фільтра відповідної ефективності. Згідно GMP, відомий підхід, що застосовується у фармацевтичному виробництві, - це багатоступенева фільтрація повітря.

Подаючи повітря в приміщення, необхідно забезпечити виконання чотирьох основних операцій.

- Повітря стиснення для подолання опору повітропроводів та арматури;
- Видалення пилу та інших частинок;
- Усунення та знищення залишкових мікроорганізмів;
- Контроль температури і вологості.

ДР 2.1.1. Забір повітря

Підготовка вентиляційного повітря передбачає вдихання повітря з атмосфери через повітрозбірник ЗП-29 через 20-30 м високий впускний вал зі стабілізованою концентрацією мікроорганізмів. Температура і вологість зовнішнього повітря, кількість пилу та мікроорганізмів не є постійними і залежать від пори року, погодних умов, географічного розташування підприємства та висоти забору повітря.

ДР 2.1.2. Механічне очищення повітря

Фільтр грубого очищення, в якому механічні частинки розміром більше 5 мкм видаляються з повітря для попереднього очищення повітря. Цей фільтр запобігає забрудненню вентилятора і зменшує кількість забруднень. Стільникові фільтри використовуються для очищення повітря від грубого пилу,

					ПБ.БТ6201.ДП	Арк.
						73
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

заповнені фільтруючими матеріалами, у даному випадку - вінілопластиковою сіткою. Фільтри ФЯВ (коміркові з вінілопластиковою сіткою) Надійний і зручний в експлуатації, для виробництва вітамінів зручно використовувати фільтри такого типу попереднього очищення повітря.

Видалення механічних домішок відбувається, коли повітря проходить через фільтр попереднього очищення F-30 з діаметром пор 5-10 мкм фільтруючого матеріалу.

ДР 2.1.3. Нагнітання повітря

При проходженні через вентилятор В-31 при тиску 0,2 МПа відбувається нагнітання повітря.

ДР 2.1.4. Кондиціонування та стабілізація параметрів повітря

Повітря потрапляє в нагрівальну колону НК-32 через вентилятор В-31. Тут усереднення та стабілізація фізико-хімічних параметрів повітря - це температура 20 ° С і вологість 40-60%. Клапан розташований на вході гарячої пари нагрітої пари і там, де конденсат скидається. Цей процес завершується у повітряному фільтрі Ф-33 діаметром пор 1,5 мкм фільтруючого матеріалу, де повітря очищується дрібними пиловими частинками та мікроорганізмами, що надходять у систему після проходження через фільтр попереднього очищення. Вентиляційне повітря подається до виходу фільтра Ф-33 для входу в будівлю.

ДР 2.2. Підготовка стерильного повітря.

ДР 2.2.1. Забір повітря

Забір атмосферного повітря проводять за допомогою повітрозабірника ЗП-22 діаметром 300 мм на висоті 20-30 метрів, аналогічно до ДР 2.1.1.

ДР 2.2.2. Нагнітання та механічна очистка повітря

Забране повітря під тиском проходить через фільтр попередньої

					ПБ.БТ6201.ДП	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		74

очистки Ф-23. На цьому етапі повітря вивільняється з частинок більше 10 мкм, що відповідає діаметру пор фільтруючого матеріалу, аналогічно ДР 2.1.2.

Після очищення фільтра ф-23 повітря нагнітається насосом Н-24 до тиску 0,2 МПа.

ДР 2.2.3. Видалення вологи з повітря

Повітря охолоджують до температури 15 ° С в кожухотрубному теплообмінника ТО-25. При цьому надлишкова волога видаляється з повітря через різку різницю температур. У цьому випадку холодоагентом є технічна холодна вода.

ДР 2.2.4. Стабілізація термодинамічних показників повітря

Охолоджене повітря поступає у ресивер РС-26, де проходить Стабілізація термодинамічних параметрів: зниження пульсації тиску, видалення залишків масляного туману. Електроприводні запірні клапани та зворотні клапани встановлюються як приймачі в лінії подачі повітря. Клапани розташовані на вході гарячої пари та на виході конденсату приймача та на виході пари, що використовується. Повітря залишає приймач при тиску 0,2 МПа та температурі 20 ° С.

ДР 2.2.5. Очищення повітря на головному фільтрі

Фільтр зі стерилізуючим ефектом очищає повітря від дрібних пилових частинок та мікроорганізмів, що потрапляють у систему після проходження через фільтр попереднього очищення. Після стабілізації в приймачі повітря надходить у типовий фільтр типу НЕРА 11 F-27 з чистотою 95%, де частинки затримуються до 1,5 мкм.

ДР 2.2.6. Очищення повітря на індивідуальному фільтрі

Після очищення на головному фільтрі повітря поступає на індивідуальні

					ПБ.БТ6201.ДП	Арк.
						75
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

фільтри типу ФТО-60 Ф-28, де затримуються часточки до 0,5 мкм. Цей фільтр може очистити до 99,999% від мікроорганізмів та їх спор. В окремих фільтрах використовуються спеціальні фільтруючі матеріали. В якості фільтруючого матеріалу рекомендується використовувати матеріали на основі базальтового надтонкого волокна, базальтової мікрОВОлокна, синтетичного волокна. Для використання не потрібен додатковий тиск. Під час процесу очищення повітря тиск у системі контролюється, і різниця може вказувати на мікробне забруднення або наявність механічних частинок. Після промивання окремими фільтрами стерильне повітря вводиться в прищепи інокуляторів І-4 та І-6 та ферментатора ФВ-8 для провітрювання культури виробника.

ДР 3. Підготовка робочих розчинів

Для цього виробництва використовуються робочі розчини, які потребують попередньої підготовки. Титруючий розчин для стабілізації рН культури.

ДР 3.1. Приготування 10%-го розчину НСІ

Розчин додають через дозатор колектора з перемішуючим пристроєм через дозатор, додаючи певну кількість кислоти і наповнюючи її необхідною кількістю питної води при 40 об / хв з подальшим перемішуванням до утворення 10% розчину НСІ, а потім зберігання робочого розчину в спеціальній ємності. Збирати (збирати) певний час. У цьому виробництві розчин застосовують для регулювання рН культурального середовища при необхідності.

ДР 4. Підготовка тари

ДР 4.1. Мийка та сушка тари

Скляні банки зі складу миються розчинами з ДР 1.2.2., ополіскуються

					ПБ.БТ6201.ДП	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		76

водою питною та сушаться 1 год.

ДР 5. Підготовка поживних середовищ

ДР 5.1. Приготування та стерилізація поживного середовища для посівного матеріалу

Основу середовища складають пшеничне борошно, рослинна олія (соняшникова), додають піногасники(ПАВи), антиокислювачі (лимонна кислота), вітаміни(тіамін) та стимулятори росту-- β -іонон. Для першої генерації: соняшниковий шрот-8-12%, меласа-1-2%, KH_2PO_4 - 0,05%, баковий відстій-4-5%, тіамін хлорид- 0,0002%. рН складає 6,0-6,5. Для другої генерації: борошно соєве-2,3%, кукурудзне-4,7%, KH_2PO_4 -0,05%, рН 6,1-6,5. Середовище для вирощування посівного матеріалу у колбах готують у колбах К-2 та стерилізують в автоклаві при температурі $121 \pm 1^\circ\text{C}$ та 0,1 МПа надлишкового тиску протягом 30 хвилин.

Для вирощування посівного матеріалу , приготування поживного середовища з наступною його стерилізацією проводять в 2 інокуляторах І-3, І-4 об'ємом 0,63 м³. На цій стадії кількість (-) форм повинна перевищити (+) форм в 10разів (10:1). Здійснюється на уніфікованому середовищі, яке містить дешеві відходи крохмалепатокового виробництва — зелену кукурудзяну патоку та кукурудзяний екстракт (джерело фосфору, вітамінів, азоту). В середовищі для ферментації, окрім цих компонентів, також міститься близько 2,0 % рослинної олії, яка необхідна для каротиноутворення. В поживних середовищах для інокуляції та ферментації повинно міститися близько 85—90 мг % амінного азоту та близько 1,0 % редукувальних цукрів; рН середовища після стерилізації повинно становити 5,9—6,3 . Певна кількість питної води завантажується в інокулятор, Додаються всі необхідні компоненти середовища при перемішуванні у відповідній

					ПБ.БТ6201.ДП	Арк.
						77
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

кількості за допомогою дозатора Д-5. Перемішування здійснювали при 30-40 об / хв протягом 30 хвилин після введення всіх компонентів середовища. Засіб охолоджують до температури 30 ° С, проводячи стерилізацію 0,3 МПа при температурі 120 ° С протягом 30 хвилин «гострою» парою, а потім подають охолоджуючу воду до кожуха інкулятора І-4. Надлишковий тиск вище 0,05 МПа.

На цьому етапі проводиться контроль мікробіологічної чистоти середовища шляхом висіву проб на чашки Петрі із подальшим інкубуванням у термостаті.

ДР 5.2. Підготовка поживного середовища для виробничого біосинтезу

В якості середовища для проведення виробничого біосинтезу каротину у ферментері Фв-6 було вибрано модифіковане середовище Циглера наступного компонентного складу, г/л: зелену кукурудзяну патоку та екстракт соєвого борошна -2,3%, кукурудзного-4,7%, K_2HPO_4 –0,05%,, також міститься близько 4,0 % рослинної олії, вода . рН = 5,9 - 6,3. [87]. Процес підготовки даного поживного середовища потребує попереднього приготування екстракту соєвого борошна.

ДР 5.2.1. Приготування екстракту соєвого борошна

Екстракт соєвого борошна готується в змішувальному реакторі. Після того, як до пристрою подається певна кількість питної води, соєве борошно із складу додається в реактор-змішувач при температурі 30-40 об / хв зі швидкістю 100 г на літр води. Екстракт готують шляхом перемішування і кипіння при 120 ° С протягом 30 хвилин.

ДР 5.2.2. Центрифугування екстракту соєвого борошна

Для відділення екстракту від завислих часточок суміші проводять його

					ПБ.БТ6201.ДП	Арк.
						78
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

центрифугування протягом 10 хвилин при 5000 об/хв, після чого осад подається на стадію знешкодження відходів, а відділений екстракт слугує компонентом поживного середовища для виробничого біосинтезу.

ДР 5.2.3. Приготування та стерилізація композиції поживного середовища

Стерилізацію після приготування живильного середовища проводять у ферментері Фв-6. Питомий об'єм екстракту соєвого шроту, приготованого та стерилізованого в змішувальному реакторі, завантажується у ферментер. Під час перемішування (30-40 об / хв) використовуйте дозатор D-7 для завантаження всіх необхідних компонентів середовища в потрібній кількості. Перемішування проводили протягом 30 хвилин після введення всіх компонентів середовища. Стерилізацію проводять при температурі 125 ° С протягом 15 хвилин при 0,3 МПа «гарячої» пари, після чого вода з-під ферментації подається в кожух ферментатора для охолодження середовища до температури 30 ° С. Надлишковий тиск становить понад 0,05 МПа. Після стерилізації всіх компонентів середовища попередньо стерилізований водний розчин лимонної кислоти (антиоксидант) надходить у ферментер через стерилізовану систему шлангів і всі компоненти знову перемішуються. На цьому етапі мікробну чистоту середовища контролюють шляхом висівання зразка на чашку Петрі, потім інкубації в термостаті, перевірки рівня рН та стабілізації до 6,1-6,5, додаючи при необхідності розчин соляної кислоти або натрію гідроксиду.

ТП 6. Підготовка посівного матеріалу.

ТП 6.1. Відновлення музейної культури B.trispora.

Вміст флакона із кріоконсервованою культурою продуценту висівають у стерильних умовах у пробірки Пр-1 із твердим поживним середовищем

					ПБ.БТ6201.ДП	Арк.
						79
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

суловим агаром та Інкубують протягом 7 діб при температурі 28 ° С у термостаті Т-3 без світла. Після інкубації перевіряють мікробну чистоту для візуальної оцінки культурних характеристик агента (розмір, форма, край, поверхня, колір, колоніальна прозорість), мікроскопічні та морфологічні характеристики.

ТП 6.2 Вирощування посівного матеріалу у колбах на качалках

Після додавання 2 мл стерильного живильного середовища в пробірку Пр-1 з посівом на твердому живильному середовищі і перемішування для утворення клітинної суспензії суспензію кількісно додають у колбу 0,75 л К-2 зі стерильним живильним середовищем у стерильних умовах. Передача. Колбу поміщають в термостат Т-3 і ставлять на качалку зі швидкістю 200 об / хв і інкубують протягом 28-56 годин при температурі 28 ° С. Контроль мікробної чистоти на цьому етапі проводиться візуально.

ТП 6.3. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі

Посівний матеріал 2 форм із колб К-2 по закінченню вирощування в термостаті Т-3 за допомогою системи стерильних шлангів передається у підготовлені інокулятори І-4 та І-6 із простерилізованим поживним середовищем через попередньо обпалений стерильний штуцер для кінцевого накопичення посівного матеріалу. Об'єм обраного апарату складає 0,63 м³ із коефіцієнтом заповнення 0,5. Процес в інокуляторах інокулятор І-4 та І-6 проходить при температурі 28°С, що забезпечується подачею води технічної гарячої в сорочку апарата, протягом 36-72 год. Інокулятори І-6 та І-4 Оснащений механічним змішувальним агрегатом - відкритою турбінною мішалкою і барботером при 200 об / хв. (1 об'єм повітря на 1 об'єм рідини за

					ПБ.БТ6201.ДП	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		80

хвилину).

Після завантаження культури в інокулятор вміст апарату перемішують за допомогою мішалки протягом 2 хвилин та відбирають у стерильну ємність певний об'єм культури для досліджень мікробіологічної чистоти та рівня рН.

ТП 7. Виробничий біосинтез

Посівна рідина з інокуляторів І-4 та І-6 закачується у ферментер ФВ-8 у кількості 5% від об'єму живильного середовища, попередньо завантаженого в пристрій та стерилізованого стерильною шланговою системою. Виробничий ферментер являє собою циліндричну ємність об'ємом 6,3 м³ та коефіцієнт наповнення 0,6. Ферментер ФВ-8 оснащений механічним змішувальним пристроєм, відкритою турбінною мішалкою зі швидкістю 3,33 с⁻¹, що забезпечує умови, необхідні для біосинтезу та генерації масових та обмінних потоків енергії. Аерацію культури проводять за допомогою вторинного диспергатора, розміщеного під мішалкою, через який очищений технологічний повітря подається через фітинги. Виробництво біосинтезу відбувається при температурі 28 ° С, що забезпечується подачею технічної гарячої води в кожух пристрою протягом 72 годин. В кінці процесу біосинтезу вміст цільового продукту в культуральному середовищі становить 2000 мг / л.

Після завантаження культури у ферментер ФВ-8 вміст апарату перемішують за допомогою мішалки протягом 2 хвилин та відбирають у стерильну ємність певний об'єм культури для досліджень мікробіологічної чистоти. Контроль мікробіологічної чистоти культури проводять шляхом висіву проб на чашки Петрі із подальшим інкубуванням у термостаті.

ТП 8. Стандартизація рН культуральної рідини

По закінченню процесу виробничого біосинтезу у ферментері ФВ-8

					ПБ.БТ6201.ДП	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		81

культуральна рідина через штуцер нижнього спуску подається у збірник 3-10, оснащений механічною мішалкою, для коригування кислотності. Рівень рН визначається за допомогою рН-метра та за необхідності доводиться до рівня 6,5. Коригування рН здійснюється подачею 10% розчину НСІ через дозатор Д-11 у визначених кількостях із подальшим перемішуванням культуральної рідини мішалкою та повторним визначенням рівня рН.

ТП 9. Екстрагування продукту з культуральної рідини

Нейтральна рН-культура подається до змішувального реактора 5м3 Р-12 насосом Н-10. Цей пристрій використовується в процесі вилучення каротину з культури, оскільки інших структур немає. Це пов'язано зі значним часом процесу (3 години) та використанням вибухонебезпечного токсичного екстрагованого етанолу.

Екстракцію проводять в реакторі Р-12, куди органічний розчинник етанол подається із композиції в об'ємі, що дорівнює об'єму культуральної середовища в пристрій через дозатор Д-13. Цей процес відбувається при енергійному перемішуванні механічним перемішуючим пристроєм зі швидкістю 3,33 с-1 протягом 3 годин при температурі 85 ° С. Під час цього процесу необхідно контролювати затуговання та тиск пристрою з вищезазначених причин.

ТП 10. Відділення екстракту центрифугуванням

У результаті процесу екстрагування каротин та супутні біологічно активні речовини перейшли із культуральної рідини у етанол, тому дана суміш потребує наступного розділення на тверду (біомасу) та легку (етанолову) фази. Апаратурне виконання цього процесу складається з надцентрифуги Ц-14, куди надходить нерозділений екстракт. Надцентрифуга

для відділення рідини включають верхній і нижній кришки у вигляді пластин, засоби для подачі вхідної суспензії, розташовані внизу ротора, і засоби для скидання очищеної рідини, розташованої вгорі. Вхідна рідина через канал надходить у роздільну камеру з ротором. Під дією відцентрового силового поля тверді частинки, що містяться в рідині, осідають на внутрішній поверхні стінки ротора з антифрикційним покриттям, а очищена рідина спочатку виводиться через отвір у поршні, а потім через отвір у верхній кришці. . Після припинення роботи ультрацентрифуги осад, накопичений на внутрішній поверхні стінки ротора, видаляється поршнем, який спускається на дно для збору твердих частинок [86].

Центрифугування проводять протягом 10 хвилин при 3000 об / хв, після чого осад і осад видаляють шляхом збору для подальшої переробки, оскільки він містить залишки етанолу і культуру виробника. Легка етанолова фаза скидається через отвір і верхню кришку поршня насосом Н-14 на герметичній шланговій системі в збірник 3-15.

ТП 11. Промивання екстракту водою

Даний процес проходить у ємності, подається у збірник 3-15, оснащений механічною мішалкою, куди через дозатор Д-15 подається питна вода зі складу в об'ємі, рівному до об'єму культуральної рідини в апараті. Процес проходить при інтенсивному перемішуванні механічним перемішувачем пристроєм із частотою обертання $3,33 \text{ c}^{-1}$ протягом 30 хв за температури 25°C .

ТП12. Упарювання та видалення розчинників, кристалізація продукту

Вакуум випарювання при 85°C для позбавлення від органічних домішок та залишків реагентів, рідину випарюють у вакуум-випарному апараті Ва-16 і концентрація сухих речовин досягає 65%.

					ПБ.БТ6201.ДП	Арк.
						83
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

ТПІ3.Промивання етилацетатом для осадження каротину
У збірник З-17 надходить через дозатор Д-18 розчин етилацетату, в якому не розчиняється каротин і утворюється чистіший кристалізований осад.

ТПІ4. Висушування екстракту.

Даний процес проходить у Розпилювальній сушарці С-19. Розпилювальні сушарки застосовуються для випаровування термічно нестійких, в'язких та пастоподібних розчинів. Усередині циліндричного корпусу пристрою, отримуючи різку пару, диск обертається на валу, розпилюючи розчин дрібними краплями. Розчин, що надходить у пристрій зверху, висихає на гарячому повітрі. Під дією відцентрової сили її кидають на стінку пристрою і фіксують до підлоги. Порошок поступово сушать при температурі 85 ° С і тиску 0,03 МПа, а на стінці пристрою залишається тонкий шар порошку каротину, який падає на дно. Сухий залишок видаляється через секторний затвор і надходить у збірник Зб-20.

ПМВ 15. Фасування готового продукту у флакони

Фасування порошку каротину відбувається на автоматичній лінії за допомогою пакувальної машини Пм-21. Порошок фасується у попередньо підготовані темні скляні флакони об'ємом 1 кг за допомогою шнекового дозатора для великих доз. Флакони закривають підготованими гумовими пробками згідно з ТУУ 6.00152253-13, обертають темним папером. Допустима похибка при фасуванні не повинна перевищувати $\pm 3\%$. На флакони на автоматичній лінії наноситься етикетка з паперу етикетного або паперу письмового, виготовлена поліграфічним способом друку або тисненням із зазначенням необхідної для зберігання, подальшої реалізації та

					ПБ.БТ6201.ДП	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		84

транспортування інформації.

ПМВ 16.. Пакування, маркування, відвантаження готового продукту

Флакони з препаратом пакують у вторинну тару - картонні коробки з перетинками згідно ГОСТ 12301, по 10 флаконів у партії. На коробку наносять або вкладають всередину друковану етикетку з інформацією щодо продукту.

ЗВ 17. Знешкодження відходів та промислових викидів

В процесі виробництва утворюється ряд відходів, які проходять стадії знезараження. Проводять знезараження вентиляційного та стерильного повітря, конденсату, некондиційного посівного матеріалу та культуральної рідини, промислових стоків, партій бракованого препарату тощо.

Очищення повітря, яке містить живі клітини мікроорганізмів, краплі культуральної рідини з продуктами метаболізму передбачає наявність спеціального сепаратора для відділення крапель і піни з подальшою очисткою від клітин мікроорганізмів в скрубєрі та повторного використання у якості вентиляційного чи технологічного повітря.

Некондиційний посівний матеріал, отриманий в посівному апараті та некондиційну культуральну рідину, отриману в ферментері, піддають термічній обробці у вказаних апаратах "гострою" парою тиском $P = 0,3$ МПа при температурі 130-132°C протягом (40 ± 5) хвилин, охолоджують подачею холодної технічної води в сорочку до 25-30°C, розбавляють водою до окислення 450-700 мг/л, доводять рН середовища до 7,0 соляною кислотою або розчином натра їдкого та зливають в загальнозаводську каналізаційну систему.

Промивні дезінфікуючі розчини, залишки розчинів СМЗ після санітарної обробки виробництва та відпрацьовану воду направляють до

					ПБ.БТ6201.ДП	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		85

збірника нейтралізації стічних вод, де розводять водою в 3-4 рази, встановлюють рН на рівні 7,0 за допомогою розчинів соляної кислоти чи їдкого натру, та зливають в загальнозаводську каналізаційну систему. В цей же збірник зливають промивні води після мийки інокулятора І-4 та ферментера Фв-6.

Тверді відходи виробництва у вигляді склобою, рукавичок, упаковочних матеріалів, бракованих флаконів, пробок та ковпачків утилізуються на міському сміттєзвалищі.

ВВ 18. Відновлення відходів

У даному виробництві широко використовуються матеріали та речовини, що можуть повторно використовуватися при належній їх обробці. Це фільтрувальні матеріали та органічні розчинники.

Відновлення тканинного фільтра, що використовується для підготовки води та повітря, відбувається так, що його замочують у гарячій воді, а потім очищають та обробляють дезінфікуючим розчином.

Пари та розчини, які використовуються на етапах екстрагування, центрифугування та випаровування, містять органічні розчинники, такі як етилацетат, лимонна кислота та етанол. Використовувана пара попередньо конденсується і надходить у регенератор (дистилятор) разом із використовуваним розчином, переганяючи до 95% об'єму використовуваного розчину для зменшення органічного розчинника. Застосування вакуумного генератора в цій установці випаровується при нагріванні і надходить у конденсатор для охолодження, знову перетворюючись у рідку форму, але знижуючи температуру кипіння розчину без домішок. Чистий розчинник протікає з конденсатора до збору чистого розчинника для повторного використання.

					ПБ.БТ6201.ДП	Арк.
						86
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

4.4. Матеріальний баланс

Матеріальний баланс виробництва для стадії біосинтезу продукту наведений в таблиці 4.2. Баланс складено для стадії, що проходить у ферментері об'ємом 6,3 м³(коеф.заповнення- 0,6).

$$V_{\text{середовища}} = 6.3 \cdot 0.6 = 3.78 \text{ м}^3 \cdot (3780 \text{ л})$$

$$m_{\text{комп.}} = \frac{V_{\text{з.ф.}} \cdot \rho_{\text{пум.ср}} \cdot C}{100 \cdot n}, \quad C - \text{конц.речовини } \%, \quad n - \text{вміст основної речовини. } (\rho_{\text{позж.серед.}} = 1010 \text{ кг/м}^3)$$

$$\text{Кукур.борошно} = (3.78 \cdot 1010 \cdot 4.7) / (100 \cdot 1) = 179.4 \text{ кг}$$

$$\text{Соєв.борошно} = (3.78 \cdot 1010 \cdot 2.3) / (100 \cdot 1) = 87.8 \text{ кг}$$

$$\text{Соняш.олія} = (3.78 \cdot 1010 \cdot 4) / (100 \cdot 1) = 152.7 \text{ кг}$$

$$\text{KH}_2\text{PO}_4 = (3.78 \cdot 1010 \cdot 0.05) / (100 \cdot 0.995) = 1.92 \text{ кг}$$

$$\text{Посівний матеріал} = 3780 \cdot 5\% = 189 \text{ кг}$$

$$\text{Вода заповнюється до кінця} = 3780 - 421.82 = 3358.2 \text{ л}$$

Таблиця 4.2. Матеріальний баланс стадії біосинтезу продукту

Використано				Отримано			
Назва сировини, матеріалів та напівпродуктів	Кількість			Назва кінцевого продукту або напівпродуктів, відходів та втрат	Кількість		
	кг	т	л		кг	шт	л
Біосинтез							
Кукурудзяне борошно	179,4			Культуральна рідина	3780		
Калій фосфорнокислий	1,92			Втрати	189		

Олія соняшникова	152,7						
Екстракт соєвого борошна	87,8						
Посівний матеріал			189				
Вода питна			3358,2				
Всього	3969			Всього	3969		
Екстракція етанолом							
Культуральна рідина	3780			Етаноловий екстракт з каротином	7560		
Етанол			3780				
Всього	7560			Всього	7560		
Центрифугування							
Суміш після екстракції	7560			Екстракт каротину	3400		
				Важка фаза	3780		
				Втрати (5%)	380		
Всього	7560			Всього	7560		
Промивання							
Екстракт	3400			Екстракт каротину	3350		

Вода питна			3400	Вода з твердими залишками			3450
Всього	6800			Всього	6800		

Випарювання							
Екстракт з розчинниками	3350			Упарений Екстракт каротину 60%	2010		
				Конденсат з розчинниками			1172
				Втрати 5%			168
Всього	3350			Всього	3350		

Екстракція етилацетатом							
Екстракт каротину	2010			Кристали каротину	1800		
Етилацетат			2010	Відходи			2220
Всього	4020			Всього	4020		

Вакуум Висушування							
Кристали каротину	1800			Сухі Кристали каротину	1710		
				Конденсат			90
Всього	1800			Всього	1800		

					ПБ.БТ6201.ДП		Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат			89

4.5. Контроль виробництва

Контроль виробництва здійснюється з метою отримання якісного продукту, що відповідає наведеним вище вимогам. Основні точки, параметри контролю та межі їх змін подані в таблиці 4.3.

Таблиця 4.3. Контроль виробництва

Назва стадії та номер контрольної точки	Об'єкт контролю та показник, що вивчається	Метод контролю	Періодичність перевірки	Нормативна характеристика показника
1	2	3	4	5
ДР 1.3 Підготовка виробничих приміщень $K_T 1.3, K_{мб} 1.3$	Запиленість приміщення	Візуально	Кожну операцію	Мінімальна
	Вміст мікроорганізмів у повітрі	Методами мікробіологічного аналізу		Кількість м/о ≤ 500 од/м ³ ,
ДР 1.4 Підготовка обладнання та комунікацій $K_T 1.4.3$	Тиск	Манометр	Кожну операцію	0,2 МПа
	Температура стерилізації	Регулятор температур		140°C
	Тривалість стерилізації	Годинник		1 год

Продовження таблиці 4.3

1	2	3	4	5
ДР 2.1 Підготовка вентиляційного повітря $K_T 2.1.5$	Температура	Термометр	Протягом процесу	20°C
	Вологість	Психрометр технічний		W=40-60%

ДР 2.2 Підготовка стерильного повітря К _Т 2.2.7	Тиск	Манометр	Протягом процесу	Стале задане значення
	Температура	Термометр		30°C
ДР 3. Підготовка робочих розчинів К _Т 3.1, К _Т 3.2, К _Т 3.3	Дозування компонентів	Дозуючий пристрій, ваговий метод	Кожну операцію	Згідно з технологією
ДР 4. Підготовка флаконів, гумових пробок, алюмінієвих ковпачків К _Т 4.1, К _Т 4.2, К _Т 4.3	Цілісність, ступінь очистки	Візуально	Кожну операцію	Відповідність кондиційному стану

Продовження таблиці 4.3

1	2	3	4	5
ДР 5. Підготовка поживних середовищ К _Т 5.1, К _{мб} 5.1, К _Т 5.2.1, К _{мб} 5.2 К _Т 5.2.3, К _{мб} 5.2.3	Дозування компонентів	Дозуючий пристрій, ваговий метод	Кожну операцію	Згідно з технологією
	Температура кінцева	Термометр		30°C
	Мікробіологічна чистота	Висів на чашки Петрі та інкубування		Відсутність сторонньої мікрофлори
	Параметри стерилізації	Термометр, манометр, годинник		125°C, 0,3 МПа, 15 хв.

ТП 6. Підготовка посівного матеріалу $K_T 6.1, K_{mb} 6.1,$ $K_T 6.2, K_{mb} 6.2,$ $K_T 6.3, K_{mb} 6.3$	Температура	Термометр	Постійно протягом процесу	28°C
	Тривалість культивування	Годинник		120 год., 72 год.
	Тиск в інокуляторі	Манометр		0,01 МПа
	Мікробіологічна чистота	Висів на чашки Петрі, візуально	Кожну операцію	Відсутність сторонньої мікрофлори
ТП 7. Виробничий біосинтез $K_T 7, K_{mb} 7$	Мікробіологічна чистота	Висів на чашки Петрі та інкубування	Кожну операцію	Відсутність сторонньої мікрофлори
	Температура	Термометр	Постійно протягом процесу	28°C
	Тиск у ферментері	Манометр		0,01 МПа
	Тривалість культивування	Годинник		72 год
ТП 8. Стандартизація рН культуральної рідини $K_x 8$	рН культуральної рідини	рН-метр	Кожну операцію	рН=7

Продовження таблиці 4.3

1	2	3	4	5
ТП 9. Екстрагування продукту з культуральної рідини К _т 9	Температура	Термометр	Постійно протягом процесу	25°C
	Тривалість процесу	Годинник		3 год
	Перемішуван ня	Тахометр		200 об/хв
ТП 10. Відділення екстракту центрифу- гуванням К _т 10	Тривалість процесу	Годинник	Постійно протягом процесу	10 хв
	Швидкість обертання	Тахометр		3000 об/хв
ТП 11. Промиванн я екстракту водою	Тривалість процесу	Годинник	Постійно протягом процесу	10 хв
	Швидкість обертання	Тахометр		3000 об/хв
ТП 12. Вакуум упарювання екстракту	Температура	Термометр	Постійно протягом процесу	40 °C
	Тиск	Манометр		0,03 МПа
ТП 13.. Екстрагува ння продукту з рідини К _т 13	Температура	Термометр	Постійно протягом процесу	25°C
	Перемішуван ня	Тахометр		200 об/хв
	Тривалість процесу	Годинник		3 год

Продовження таблиці 4.3

1	2	3	4	5
ТП 14. висушування фракції продукту К _т 14	Температур а	Термоме тр		45 °C
	Тиск	Маномет р		0,03 МПа

ПМВ 15. Фасування,Пакуван ня готового продукту К _т 15	Маса у банці	Автомат ично	Кожну операцію	По 1кг у банці
ПМВ 16. Пакування, маркування, відвантаження готового продукту К _т 16	Кількість банок у картонній коробці	Візуальн о	Кожну операцію	По 10 банок у коробці
1	2	3	4	5
ЗВ 17. Знешкодження відходів та промислових викидів К _х 17	Концентрац ія відходів	Кількісни й хімічний та мікро- біологічний аналіз	Кожну операцію	Відповідно до санітарних правил і норм
ВВ 18. Відновлення відходів К _х 18, К _т 18	Наявність хімічних, механічних, мікро- біологічних забруднень	Кількісни й хімічний та мікро- біологічний аналіз	Кожну операцію	Відповідно до НТД для даного матеріалу чи речовини

4.6. Технологічна схема

Технологічна схема виробництва ландоміцину А подана на аркуші формату А1 у графічній частині дипломного проекту.

РОЗДІЛ 5. РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ

5.1 Обґрунтування вибраної конструкції ферментеру

Ферментер будь-якої конструкції має задовольняти основним потребам процесу культивування клітин: забезпечити підвід до кожної клітини в достатній кількості всі поживні речовини; забезпечити відвід від кожної клітини продуктів метаболізму; забезпечити термостатування мікробної суспензії до кожної точки ферментаційного середовища; забезпечити підтримку оптимальних робочих параметрів в кожній точці робочого об'єму, забезпечити необхідний рівень перемішування та аерації (якщо є потреба), забезпечити високий рівень автоматизації процесу культивування, техніки безпеки та умов праці операторів.

Розрізняють механічні, ерліфтні і газо-вихрові біореактори, а також аеробні (з подачею повітря або газових сумішей з киснем), анаеробні (без подачі кисню) і комбіновані – аеробно-анаеробні.

В даному випадку обрано Ферментер для глибинного аеробного культивування. При глибинному культивуванні в аеробних умовах необхідно постійно забезпечувати надходження у середовище кисню. В залежності від цього відрізняються і конструкції ферментерів, так газорідинні ферментери ділять на ферментери з механічним диспергуванням газу, ерліфтні та струминні.

У процесі повного змішування, зростання культур мікроорганізмів відбувається в реакторі-ферментері при інтенсивному перемішуванні культурального середовища за допомогою мішалок (турбулентний режим). При цьому в будь-якій точці ферментера всі параметри середовища повинні бути приблизно однакові. Зміна всіх параметрів культивування відбувається тільки в

					ПБ.БТ6201.ДП			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат				
Розробив		Бездрабко А.Д.			РОЗДІЛ 5. РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ	Стадія	Аркуш	Аркушів
Консульт.		Фесенко				Д	95	122
		Литвинов				КПІ ім. І. Сікорського. ФБТ		

часі.

Найбільше розповсюдження отримав ферментер з механічною мішалкою та підводом повітря через барботер, має рубашку чи змієвик для підводу або відводу тепла.

До конструкції ферментерів та інокуляторів виставляють високі потреби у відношенні герметичності. Сварка швів має бути щільна. Виділення вологи на зварних швах при гідравлічних випробовуваннях не допускається, так як це може призвести до потрапляння інфекції у культуральне середовище. Необхідно також забезпечити щільність сальнику робочого валу апарату, прокладок люків та фланцевих з'єднань. Апарат виготовляють з нержавіючої або двошарової сталі. Для попередження потрапляння в апарат інфекції під час вирощування культури в процесі роботи під кришкою апарату надлишковий тиск має становити 0,15-0,25 кг/см².

Сучасні багатотоннажні біотехнологічні підприємства віддають перевагу ферментерам змішування вертикального типу з одно валовим багатоярусним перемішуючим пристроєм і серед таких ферментерів з найбільш відомих конструкцій є ферментер Ф-6,3-1К-01 для асептичного культивування . Ферментер оснащений системою мийки та стерилізації насиченою водяною парою, для герметизації місця введення валу в апарат застосовано торцеве ущільнення з термічним затвором типу ТТ. Підведення стерильного повітря здійснюється через барботер. Для регулювання температури культивування використовується багатосекційна зовнішня сорочка та 4 вбудовані спіральні теплообмінники, які приймають участь у створенні циркуляційних контурів КР. Потужність привода механічного перемішуючого пристрою зі швидкістю обертання 3,27с-1 90 кВт.

Найбільше розповсюдження в промисловості отримало перемішування з введенням в середовище, яке змішується, механічної енергії із зовнішнього джерела. Механічне перемішування здійснюється за допомогою змішувачів, яким надається обертовий рух або безпосередньо від електродвигуна, або через редуктор чи клиноремінну передачу. Механічні перемішуючі пристрої складаються з трьох основних частин: власне мішалки, валу і приводу. Мішалка – робочий елемент приладу, який закріплюється на горизонтальному, вертикальному чи нахиленому валу.

					ПБ.БТ6201.ДП	Арк.
						97
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

По влаштуванню лопатей вирізняють змішувачі лопатеві, пропелерні, турбінні, якірні, рамні та інші.[90]

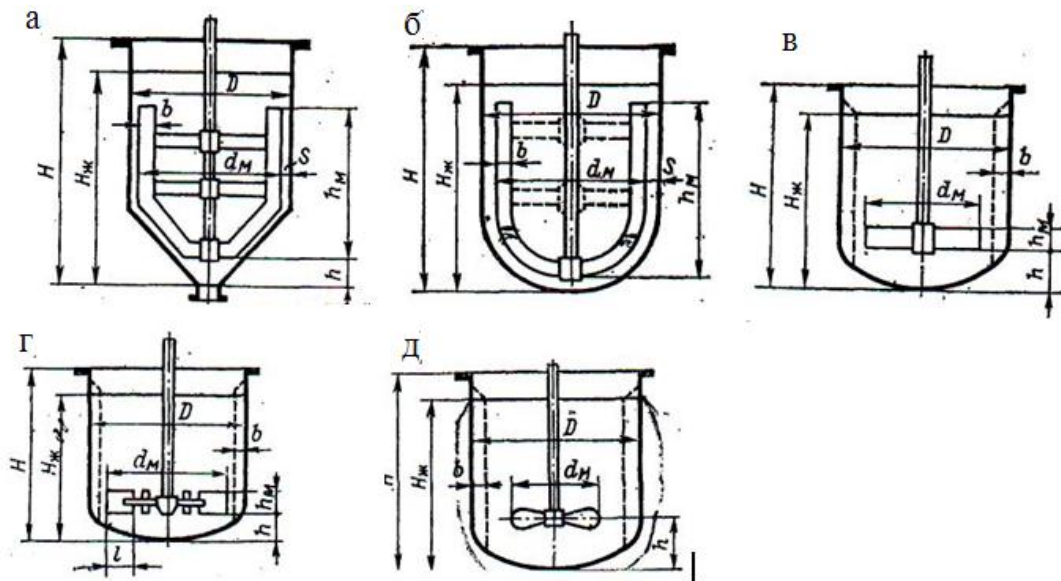


Рис 5.1 Типи мішалок: а) лопастна; б) якірна; в) рамна;
г) турбінна; д) пропелерна

При високих швидкостях обертання мішалок рідина, яка переміщується, втягується в круговий рух і навколо валу утворюється воронка, глибина якої збільшується зі зростанням числа обертів і зменшенням густини і в'язкості середовища. Для запобігання утворення воронки в апараті розміщують відбивні перегородки, які, крім цього, сприяють виникненню вихорів і збільшенню турбулентності системи.

Для забезпечення більш інтенсивного перемішування в горизонтальній і вертикальній площинах використовують турбінні мішалки.

Турбінні мішалки швидкохідні, мають форму колеса водяних турбін з плоскими, нахиленими чи криволінійними лопатками, що закріплені, як правило, на вертикальному валу. В апаратах з турбінними мішалками використовують, найчастіше, радіальні потоки рідини.

Турбінні мішалки бувають двох типів:

- відкриті;
- закриті.

Відкриті турбінні мішалки являють собою, по суті, вдосконалену конструкцію простих лопатевих мішалок. Обертання декількох лопатей, розташованих під кутом до вертикальної площини, створює поряд з радіальними потоками осьові потоки

рідини, що сприяє інтенсивному перемішуванню її у великих обсягах. Інтенсивність перемішування зростає при установці в посудині відбивних перегородок [89].

Закриті мішалки мають два диски з отворами в центрі для проходження рідини; диски зверху та знизу приварюються до плоских лопатей. Радіальні потоки рідини мають достатньо велику швидкість і поширюються по всьому перерізу, досягаючи найбільш віддалених точок апарату. Рідина поступає в змішувач паралельно осі валу. У колесі змішувача рідина плавно змінює напрямок від вертикального (по осі) до горизонтального (по радіусу) і викидається з колеса з великою швидкістю. При такому направленому і багаторазово повторюваному в одиницю часу русі рідини досягається швидке і ефективне перемішування її у всьому обсязі посудини [91].

Для поліпшення і прискорення перемішування застосовують турбінні мішалки з лопатями або колесами, розташованими на різній висоті. Турбінні змішувачі забезпечують інтенсивне перемішування у всьому об'ємі апарату. При великих значеннях відношення висоти до діаметра апарату використовують багаторядні турбінні змішувачі.

Потужність, яку використовують змішувачі, що працюють в апаратах з відбійними перегородками, при турбулентному режимі перемішування майже не залежить від в'язкості середовища. Тому змішувачі цього типу можуть вільно використовуватись для сумішей, в'язкість яких під час перемішування змінюється.

Для перемішування в великих об'ємах (наприклад, при гомогенізації рідин в сховищах, об'єм яких досягає 2500 м³ і більше) турбінні змішувачі менш придатні, ніж пропелерні змішувачі чи сопла.

В залежності від області використання турбінні мішалки зазвичай мають діаметр $d = (0,15-0,65) D$ при відношенні висоти рівня рідини до діаметра апарату не більше двох. При більших значеннях цього відношення використовують багаторядні змішувачі.

Число обертів мішалки коливається в межах 2-5 в секунду, а окружна швидкість складає 3-8 м/с [89].

Переваги турбінних мішалок:

- 1) швидкість перемішування і розчинення;
- 2) ефективне перемішування в'язких рідин;
- 3) придатність для безперервних процесів.

Недоліками турбінних мішалок є:

					ПБ.БТ6201.ДП	Арк.
						99
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

- 1) порівняльна складність;
- 2) висока вартість виготовлення;
- 3) малопридатні для перемішуванні у великих об'ємах

Області застосування турбінних мішалок:

- 1) інтенсивне перемішування і змішування рідин різної в'язкості, яка може змінюватися в широких межах;
- 2) тонке диспергування і швидке розчинення;
- 3) скаламучування осадів у рідинах, що містять 60 % і більше твердої фази (для відкритих мішалок до 60%); допустимі розміри твердих частинок: до 1,5 мм для відкритих мішалок, до 25 мм для закритих мішалок [91].

ТЕХНІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ФЕРМЕНТЕРУ

Апарат призначений для біосинтезу бета-каротину з культуральної рідини

Blakeslea trispora K2.

1. Номінальний об'єм,	6,3 м ³
2. Тип перемішуючого пристрою – мішалка	турбінна відкрита
3. Кількість мішалок	1
4. Кількість відбивних перегородок	0
5. Частота обертання вала мішалки	3,33с ⁻¹
6. Потужність електродвигуна	2,2 кВт
7. Габаритні розміри:	
- довжина	2710мм
- ширина	2710мм
- висота	2780мм
8. Маса	5200кг

					ПБ.БТ6201.ДП	Арк.
						100
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

5.2. Конструктивний розрахунок

Вихідні дані для розрахунку:

Загальний об'єм апарату:

$$V_{заг}=6,3\text{ м}^3;$$

Коефіцієнт заповнення:

$$K=0,6;$$

Тип перемішуючого пристрою:

лопатева турбінна мішалка.

Теплофізичні характеристики суміші культуральної рідини, яка містить біомасу *Blakeslea trispora*, залишки поживного середовища та синтезовані біологічно активні речовини [93]:

Температура:

$$t = 25^{\circ}\text{C}.$$

Густина:

$$\rho=1010\text{ кг/м}^3$$

Динамічна в'язкість:

$$\mu=1,55 \cdot 10^{-3}\text{ Па}\cdot\text{с}$$

Розраховуємо робочий об'єм апарата:

$$V_p = V_{заг} \cdot K_z = 6,3 \cdot 0,6 = 3,78\text{ м}^3$$

Внутрішній діаметр апарата приймаємо згідно з нормативним документом ГОСТ 20680-75 для вертикальних апаратів з механічними перемішуючими пристроями [94]:

$$D_{вн}=1800\text{ мм}.$$

Еліптичні днища за ГОСТ 6533-78 для апарата вказаного діаметра мають наступні характеристики [88]:

внутрішній діаметр

$$D_{вн}=1800\text{ мм}$$

внутрішня поверхня

$$F=3,74\text{ м}^2$$

висота еліптичної частини

$$h_6=450\text{ мм}$$

висота відбортаної частини

$$h_1=40\text{ мм}$$

товщина стінки

$$S=6\text{ мм}$$

об'єм днища

$$V_{дн}=0,8617\text{ м}^3$$

маса днища :

$$m_{дн}=177,5\text{ кг}$$

Для даного апарату обрано товщину стінки $s = 6\text{ мм}$.

Повна висота днища апарату [95]: $h_{дн.} = h_6 + h_1 = 40 + 450 = 490\text{ мм}$

Висота рідини в апараті розраховується за формулою [92]:

					ПБ.БТ6201.ДП	Арк.
						101
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

$$H_p = \frac{4(V_p - V_{\text{дн}})}{\pi D^2} + h_{\text{дн}} = \frac{4(3,78 - 0,8617)}{3,14 \cdot (1,8)^2} + 0,49 = 1,64 \text{ м}$$

де $V_{\text{дн}}$ – об'єм рідини в днищі, м^3 ;

$h_{\text{дн}}$ – висота днища

Повний об'єм V_n розраховуємо за формулою [96]:

$$V_n = V_{\text{ц}} + 2 \cdot V_{\text{дн}}$$

звідки знаходимо об'єм циліндричної частини апарату [92]:

$$V_{\text{ц}} = V_n - 2 \cdot V_{\text{дн}} = 6,3 - 2 \cdot 0,8617 = 4,58 \text{ м}^3.$$

Висота циліндричного апарату [92]:

$$H_{\text{ц}} = \frac{(V_n - 2 \cdot V_{\text{дн}})}{F_{\text{пер}}} = \frac{V_{\text{ц}}}{F_{\text{пер}}};$$

де $F_{\text{пер}}$ – площа перерізу по внутрішньому діаметру, що розраховується за формулою [92]:

$$F_{\text{пер}} = 0,785 \cdot D_{\text{вн}}^2 = 0,785 \cdot (1,8)^2 = 2,54 \text{ м}^2$$

Тоді:

$$H_{\text{ц}} = \frac{V_{\text{ц}}}{F} = \frac{V_{\text{ц}} \cdot 4}{\pi \cdot D_{\text{вн}}^2} = \frac{4,58 \cdot 4}{3,14 \cdot 1,8^2} = 1,8 \text{ м}.$$

Висота рівня рідини в циліндричній частині апарату:

$$H_{\text{рц}} = \frac{4(V_p - V_{\text{дн}})}{\pi \cdot D_{\text{вн}}^2} = \frac{4(3,78 - 0,8617)}{3,14 \cdot 1,8^2} = 1,28 \text{ м}.$$

Висота стовпа рідини в реакторі:

$$H_p = H_{\text{рц}} + h_{\text{дн}} = 1,28 + 0,49 = 1,77 \text{ м}.$$

Загальна висота апарату без приводу, без штуцерів, без опор складає [92]:

$$H_{\text{заг}} = H_{\text{ц}} + 2 \cdot h_{\text{дн}} = 1,8 + 2 \cdot 0,49 = 2,78 \text{ м}.$$

					ПБ.БТ6201.ДП	Арк.
						102
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

5.2.1. Розрахунок механічного перемішуючого пристрою

Для даного апарату було обрано механічний перемішуючий пристрій - відкриту турбінну шестилопатевою мішалку, виходячи з мети перемішування та природи середовища у ферментері. Так як в'язкість перемішуваного середовища становить $\mu < 10$ Па·с, то використання даної конструкції є цілком виправданим. Конструкція відкритої турбінної мішалки наведена на рисунку 5.2.

Діаметр турбінної мішалки визначаємо за ГОСТ 20680-85 [92]:

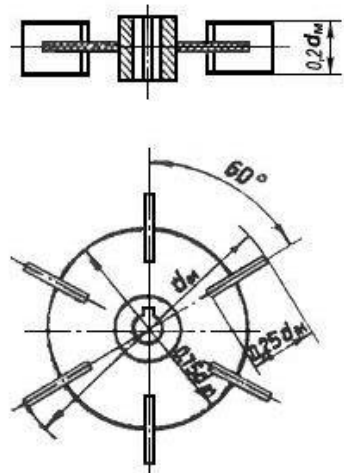


Рис.5.2 Відкрита турбінна
мішалка

$$d_m = D/4 = 1,8/4 = 0,45 \text{ м}$$

Дане значення діаметру мішалки є стандартним.

Визначаємо основні параметри мішалки [92]:

висота лопатей: $h_m = 0,2 d_m = 0,45 \cdot 0,2 = 0,09 \text{ м}$

відстань до днища апарату: $h_m = 0,7 d_m = 0,45 \cdot 0,7 = 0,315 \text{ м}$

коефіцієнт гідравлічного опору мішалки $\xi_m = 8,4$.

Частота обертів мішалки згідно з обраною технологією становить:

$$n = 200 \text{ об/хв} = 3,27 \text{ об/с}.$$

Округлюємо дане значення до стандартного:

$$n = 3,33 \text{ об/с}.$$

5.2.2. Розрахунок глибини воронки

Розраховуємо критерій Рейнольдса [97]:

$$Re_{\text{вц}} \frac{n \cdot \rho \cdot d_M^2}{\mu} = \frac{3,3 \cdot 1010 \cdot 0,45^2}{1,55 \cdot 10^{-3}} = 435440$$

де d_M – розмір перемішуючого пристрою, м;

ρ – густина суміші культуральної рідини та етилацетату, $\frac{\text{кг}}{\text{м}^3}$;

μ – динамічна в'язкість суміші культуральної рідини, Па · с;

n – частота обертів мішалки, с^{-1} .

Параметр висоти завантаження апарата γ [97]:

$$\gamma = 8 \frac{H_p}{D} = 8 \frac{1,77}{1,8} + 1 = 8,87$$

де H_p – висота рідини в апараті, м;

D – внутрішній діаметр апарата, м.

Параметр гідравлічного опору мішалки E [97]:

$$E = \frac{\gamma}{\xi'_M z'_M Re_{\text{вц}}^{0,25}} = 0,04$$

де ξ'_M – коефіцієнт гідравлічного опору мішалки ;

z'_M – кількість мішалок на одному валу.

За значенням параметру E графічним методом знаходимо параметр розподілення швидкості ψ_1 та параметр глибини воронки B [92]:

$$\psi_1=0; B=f(\psi_1)=1.$$

Глибина воронки [97]:

$$h_B = \frac{B n^2 d_M^2}{2} = \frac{1 \cdot 3,3^2 \cdot 0,45^2}{2} = 1,12 \text{ м}$$

Гранично допустима глибина воронки [98]:

$$h_{\text{гр}} = H_p - h = 1,77 - 0,315 = 1,455 \text{ м}$$

де h – висота встановлення мішалки над днищем.

					ПБ.БТ6201.ДП	Арк.
						104
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

Як видно з розрахунків, відношення $h_B < h_{cr}$ виконується, а отже, ферментер не потребує встановлення внутрішніх відбійних перегородок [97].

5.2.3. Розрахунок потужності, що витрачається на перемішування

Потужність, що витрачається на перемішування:

$$N = K_N \cdot \rho_p \cdot n^3 \cdot d_M^5 = 0,9 \cdot 1010 \cdot 3,33^3 \cdot 0,45^5 = 619 \text{ Вт}$$

де K_N – коефіцієнт потужності, який знаходять за графіками на рисунку 5.3[92]: $K_N = 0,9$.

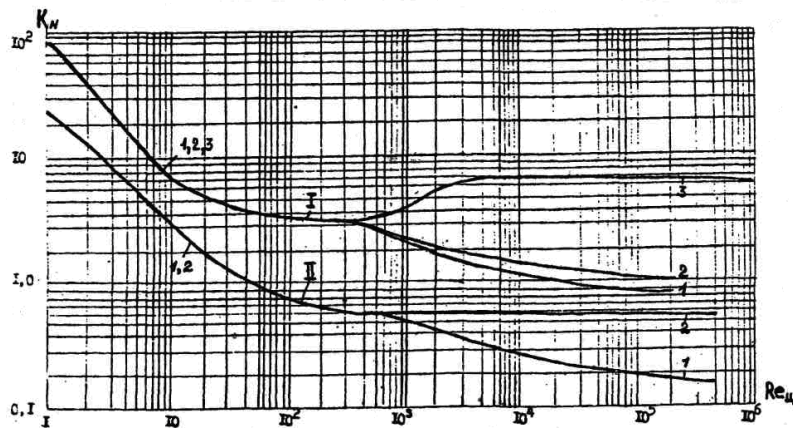


Рис. 5.3. Число $K_N = f(Re_u)$:

I – турбінна мішалка при $\xi_M = 8,4$; 1- апарат без перегородки, $z_D = 3$; 2 – без перегородки, $z_D = 4$; 3 – апарат з перегородкою, $z_D = 3-4$.

II – лопасті мішалки при $\xi = 0,88$; 1 – без перегородки при $z_D = 1,5$; 2 – з перегородкою при $z_D = 1,5$.

5.2.4. Розрахунок потужності привода мішалки

При розрахунку потужності привода мішалки необхідно врахувати потужність, що витрачається в ущільненні валу мішалки та на подолання опору внутрішніх пристроїв реактора.

Потужність, що витрачається на тертя в ущільненнях валу мішалки залежить від діаметра валу d_b в місці ущільнення.

Значення d_b можна знайти наближеним співвідношенням [97]:

$$d_b = C \cdot d_M = 0,117 \cdot 0,45 = 0,053 \text{ м.}$$

Коефіцієнт C вибирається в залежності від конструкції мішалки за таблицею 5.1 [96].

Назва мішалки	C
Турбінна	0,117

Таблиця 5.1. Значення коефіцієнту C

Знайдене за формулою значення діаметра вала округляється до більшого стандартного.

Значення d_v приймемо зі стандартного ряду [97]:

$$d_v = 0,065 \text{ м.}$$

Торцеве ущільнення обираємо тому, що воно має високу герметичність у порівнянні з аналогами, чому приділяється велика увага. Торцеве ущільнення має високий ККД, високу зносостійкість, довговічність, добре працює при наявності биття вала. Тип ущільнення Т1 (ТТ) - подвійне з термічним затвором. Потужність, яка втрачається у подвійному торцевому ущільненні [94]:

$$N_{ущ} = 10440 d_v^{1,3}$$

$$N_{ущ} = 10440 d_v^{1,3} = 10440 \cdot 0,065^{1,3} = 297,87 \text{ Вт}$$

Потужність привода мішалки розраховуємо за формулою [98]:

$$N_{ел} = \frac{(K_n K_H \cdot \sum K_i \cdot N + N_{ущ})}{\eta} = 1639,9 \approx 1640 \text{ Вт}$$

де $K_n=1,25$ – в апараті без перегородок;

$$K_H = \sqrt{\frac{H_p}{D}} = \sqrt{\frac{2,25}{2,2}} = 1,01 \text{ – коефіцієнт, що враховує рівень рідини в апараті;}$$

$$\sum K_i = 1,1(\text{термометр}) + 1,1(\text{пристрій для вимірювання рівня рідини}) = 2,2$$

$$\eta = 0,85 \div 0,9 \text{ – коефіцієнт корисної дії привода.}$$

Знайдене значення $N_{ел}$ округлюємо до найближчого стандартного:

$$N_{ел} = 1,5 \text{ кВт.}$$

Згідно даних розрахунків візьмемо з каталогу електродвигунів стандартний двигун та ротор: привід вертикальний з кінцевою опорою вала АИР112МА8 потужністю 2,2 кВт та швидкістю обертання валу 200 об/хв або $3,33 \text{ с}^{-1}$.

					ПБ.БТ6201.ДП	Арк.
						106
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

5.2.5. Тепловий розрахунок

Теплообмінні пристрої ферментера повинні забезпечувати підтримку певної температури протягом всього циклу. Метою теплового розрахунку є визначення теплового навантаження ферментеру і поверхні теплообміну теплообмінних пристроїв апарату.

В процесах нагрівання (охолодження) середовища в апаратах тепла енергія підводиться (відводиться) теплоносієм, що поступає в теплообмінні пристрої апарата: сорочку або (та) зміювик.

Теплота, що підводиться до середовища в апараті (нагрівання) або відводиться від нього (охолодження) визначається з рівняння теплового балансу. Розрахунок ведемо за надходженнями та витратами теплової енергії.

Розрахунок об'ємів поживного середовища і посівного матеріалу :

$$V_p = V_{nc} + V_{nm}$$

$$V_{nc} = 0,7 \cdot V_p = 0,7 \cdot 3,78 = 2,7 \text{ м}^3;$$

$$V_{nm} = 0,3 \cdot V_p = 0,3 \cdot 3,78 = 1,1 \text{ м}^3.$$

Теплофізичні властивості поживного середовища (17% розчину меляси) при визначальній температурі – $t_{cp} = 20 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

$$\rho_{кр} = \rho_{nc} = \rho_{nm} = 1010 \frac{\text{кг}}{\text{м}^3};$$

$$c_{кр} = c_{nc} = c_{nm} = 4,073 - 0,00134 \cdot (14,4 \cdot x - t_{cp1});$$

$$c_{кр} = c_{nc} = c_{nm} = 4,073 - 0,00134 \cdot (14,4 \cdot 17 - 20) = 3,788 \cdot 10^3 \frac{\text{Дж}}{\text{кг} \cdot \text{К}}.$$

Розрахунок маси поживного середовища, посівного матеріалу та культуральної рідини:

$$M_{nc} = \rho_{nc} \cdot V_{nc} = 1010 \cdot 2,7 = 2727 \text{ кг};$$

$$M_{nm} = \rho_{nm} \cdot V_{nm} = 1010 \cdot 1,1 = 1111 \text{ кг};$$

$$M_{кр} = \rho_{кр} \cdot V_{кр} = 1010 \cdot 3,8 = 3838 \text{ кг}.$$

Надходження енергії у ферментер для вирощування посівного матеріалу відбувається :

1) з поживним середовищем:

$$E_{nc} = M_{nc} \cdot C_{nc} \cdot t_{nc}$$

					ПБ.БТ6201.ДП	Арк.
						107
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

$$E_{nc} = 2727 \cdot 3772 \cdot 20 = 205,72 \text{ МДж.}$$

2) з посівним матеріалом:

$$E_{пм} = M_{пм} \cdot C_{пм} \cdot t_{пм};$$

$$E_{пм} = 1111 \cdot 3772 \cdot 20 = 83,813 \text{ МДж.}$$

3) теплота, що виділяється в результаті дисипації механічної енергії від перемішуючих пристроїв:

$$E_{дис1} = N_{уст} \cdot \tau_{пр};$$

$$E_{дис1} = 4920,49 \cdot 86400 = 425,13 \text{ МДж.}$$

4) теплота реакції

В поживному середовищі (17% розчин меляси) кількість сухих речовин становить :

$$m_{цук} = 0,17 \cdot M_{nc} = 0,17 \cdot 2727 = 463,59 \text{ кг,}$$

з них 76% цукру, тобто 352,3 кг.

$$E_p = \frac{m_{цук} \cdot r_{цук}}{\tau_{пр}};$$

Де теплота згорання цукрів:

$$r_{цук} = \frac{21800}{0,18} = 1211111 \frac{\text{Дж}}{\text{кг}}.$$

Таким чином:

$$E_p = \frac{463,59 \cdot 1211111}{86400} = 0,00649 \text{ МДж.}$$

Сумарна кількість надходження теплоти у інокулятор:

$$\sum E_{надх} = E_{nc} + E_{пм} + E_{дис1} + E_p;$$

$$\sum E_{надх} = 205,72 + 83,813 + 425,13 + 0,00649 = 787,07 \text{ МДж.}$$

Витрати теплової енергії здійснюються :

1) з культуральною рідиною:

$$E_k = M_k \cdot C_k \cdot t_k = \rho_k \cdot V_p \cdot C_k \cdot t_k;$$

де $t_k = 28^\circ\text{C}$ – температура культуральної рідини,

$C_k = 4070 \text{ Дж/кг} \cdot \text{К}$ – питома теплоємність культуральної рідини,

					ПБ.БТ6201.ДП	108
						Апр.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

$\rho_k = 1085 \text{ кг/м}^3$ – густина культуральної рідини,

$$E_k = 1085 \cdot 3,8 \cdot 4070 \cdot 28 = 469,86 \text{ МДж.}$$

2) втрати теплоти в навколишнє середовище при нагріванні:

$$E_{\text{втр}} = 0,02 \cdot E_k;$$

$$E_{\text{втр}} = 0,02 \cdot 469,86 = 9,4 \text{ МДж.}$$

Сумарні витрати становлять:

$$\sum E_{\text{витрат}} = E_k + E_{\text{втр}};$$

$$\sum E_{\text{витрат}} = 469,86 + 9,4 = 479,26 \text{ МДж.}$$

Таким чином теплове навантаження у ферментері становить:

$$E_m = \sum E_{\text{витрат}} - \sum E_{\text{надх}};$$

$$E_m = 479,26 - 787,07 = -307,81 \text{ МДж.}$$

Тобто з системи необхідно відводити тепло .

$$Q = |E_T| = 307,81 \text{ МДж.}$$

$$Q = M_T \cdot C_T \cdot (t_{\text{ТП}} - t_{\text{ТК}}).$$

$$\text{Звідки: } M_m = \frac{Q}{C_m \cdot \Delta t_m};$$

де $C_m = 4182 \text{ Дж/кг} \cdot \text{K}$ – питома теплоємність теплоносія,

$\Delta t_m = 2^\circ\text{C}$ – різниця між початковою та кінцевою температурами теплоносія,

$$M_m = \frac{307,81 \cdot 10^6}{4200 \cdot 2} = 36644 \text{ кг.}$$

Масові витрати теплоносія:

$$G_m = \frac{M_m}{\tau_{\text{пр}}};$$

$$G_m = \frac{36644}{86400} = 0,424 \frac{\text{кг}}{\text{с}}.$$

Визначаємо початкову та кінцеву температури теплоносія

де, $\Delta t_{\text{ср}} = 2^\circ\text{C}$.

Тоді:

$$t_{\text{mn}} = 31^\circ\text{C};$$

$$t_{\text{mk}} = 29^\circ\text{C};$$

$\delta_{\text{ст}} = 0,006 \text{ м}$ – товщина стінки,

$D_c = 1,9 \text{ м}$ – діаметр сорочки ферментера.

					ПБ.БТ6201.ДП	Арк.
						109
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

Певні розміри відносно діаметрів ферментера: $a = 0,03$ м; $b = 0,25$ м.

Еквівалентний діаметр:

$$d_{\text{екв}} = \frac{4ab}{2(a+b)};$$

$$d_{\text{екв}} = \frac{4 \cdot 0,0075}{2(0,25 + 0,03)} = 0,054 \text{ м.}$$

Середній діаметр ферментера:

$$D_{\text{ср}} = D_c - a;$$

$$D_{\text{ср}} = 1,9 - 0,03 = 1,87 \text{ м.}$$

Для визначення поверхні теплообміну необхідно знайти коефіцієнт тепловіддачі від теплоносія у сорочці та від середовища у посівному апараті та коефіцієнт теплопередачі.

Для розрахунку коефіцієнту тепловіддачі від середовища до стінки визначаємо:

Критерій Нуссельта визначаємо з критеріального рівняння :

$$Nu_c = 1,35 Re_c^{0,59} \cdot Pr_c^{0,38} \cdot Fr_c^{0,1} \left(\frac{\mu_c}{\mu_{\text{ст}}} \right)^{0,14}.$$

Критерій Рейнольдса:

$$Re_c = \frac{\rho_c \cdot n \cdot d_M^2}{\mu_c};$$

$$Re_c = \frac{1010 \cdot 3,3 \cdot 0,45}{1,55 \cdot 10^{-3}} = 967,65 \cdot 10^3.$$

Критерій Прандтля:

$$Pr_c = \frac{\mu_c \cdot c_c}{\lambda_c};$$

$$Pr_c = \frac{1,55 \cdot 10^{-3} \cdot 3788}{0,521} = 11,27.$$

Критерій Фруда:

$$Fr_c = \frac{n^2 \cdot d_M}{g};$$

$$Fr_c = \frac{(3,3^2 \cdot 0,45)}{9,81} = 0,4995.$$

$$Nu_c = 1,35 \cdot (967,65 \cdot 10^3)^{0,59} \cdot 11,27^{0,38} \cdot 1 \cdot 0,4995^{0,1} = 10371,07$$

Коефіцієнт тепловіддачі від культуральної рідини у ферментері становить:

					ПБ.БТ6201.ДП	Арк.
						110
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

$$\alpha_c = \frac{Nu_c \lambda_c}{D};$$

$$\alpha_c = \frac{10371 \cdot 0,521}{1,8} = 3001,8 \frac{Вт}{м^2 \cdot К}.$$

Теплофізичні властивості теплоносія :

$$\rho_m = 985,7 \frac{кг}{м^3};$$

$$C_m = 4163 \frac{кДж}{кг \cdot К};$$

$$\lambda_m = 0,6514 \frac{Вт}{м \cdot К};$$

$$\vartheta_m = 532,27 \frac{м^3}{с}.$$

Коефіцієнт тепловіддачі теплоносія в сорочці визначають з наступної формули :

$$\alpha_m = \alpha_{m1} (1 + 3,54 \frac{d_{екв}}{D_{ср}}).$$

α_{m1} визначаємо з формули:

$$\alpha_{m1} = \left(\frac{Nu_m \cdot \lambda_m}{d_{екв}} \right) = \frac{53,85 \cdot 0,6514}{0,054} = 649,6 \frac{Вт}{м^2 \cdot К}.$$

Критерій Нуссельта розраховуємо за формулою:

$$Nu_T = 0,008 \cdot (Re_m^{0,9} \cdot Pr_m^{0,43}) = 0,008 \cdot 10000^{0,9} \cdot 3,402^{0,43} = 53,85.$$

Відповідно швидкість теплоносія:

$$W_m = \frac{V_m}{a \cdot b} = \frac{0,00043}{0,03 \cdot 0,146} = 0,1 \frac{м}{с}.$$

Об'ємні витрати теплоносія:

$$V_m = \frac{G_m}{\rho_m} = \frac{0,424}{985,7} = 0,00043 \frac{м^3}{с}.$$

Критерій Рейнольдса:

$$Re_T = \frac{W_T \cdot d_{екв}}{\vartheta_T} = \frac{0,1 \cdot 0,054}{0,540 \cdot 10^{-6}} = 10000;$$

$2300 < Re_m < 10000$, тому для визначення коефіцієнту тепловіддачі можна використати рівняння:

$$\alpha_T = 649,6 \cdot (1 + 3,54 \frac{0,054}{1,87}) = 716 \frac{Вт}{м^2 \cdot К}$$

Коефіцієнт теплопередачі становить :

					ПБ.БТ6201.ДП	Арк.
						111
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

$$K = \frac{1}{\frac{1}{\alpha_c} + \frac{\delta_{ст}}{\lambda_{ст}} + \frac{1}{\alpha_t}};$$

Розрахункова поверхня теплообміну :

$$F_p = \frac{Q}{K \cdot \Delta t_{cp} \cdot \tau_{пр}}$$

$$\Delta t_{\delta} = 31 - 28 = 3^{\circ}C;$$

$$\Delta t_m = 29 - 28 = 1^{\circ}C.$$

$$\Delta t_{cp} = \frac{\Delta t_{\delta} - \Delta t_m}{\ln \frac{\Delta t_{\delta}}{\Delta t_m}} = 1,821^{\circ}C$$

$$F_p = \frac{307,81 \cdot 10^6}{476,19 \cdot 1,821 \cdot 864000} = 6,75 \text{ м}^2.$$

Розрахована площа теплообміну має бути меншою за дійсну площу, яку забезпечує даний теплообмінник.

$$F_p < F_d$$

За ГОСТ 9931-85 допустима площа за заданого об'єму та діаметру є рівною 9,4 м².

Умова теплообміну виконується, оскільки:

$$6,75 < 9,4 \text{ м}^2.$$

5.3 Вибір загальнозаводського обладнання

Деякі стадії технологічного процесу потребують перекачування рідин, поживного середовища або посівного матеріалу по трубопроводах. Також відбувається подача шкідливих та вибухонебезпечних речовин, таких як етанол та етилацетат. Для цього використовуються насоси, що унеможливають викиди речовин у навколишнє середовище. Для таких цілей було обрано центробіжний герметичний електронасос типу ХГВ (ГОСТ 20791-75Е) та ЦНГ у вибухозахищеному виконанні. Завдяки відсутності сальникових і торцевих укріплень, при подачі і відводі технологічних рідин дані насоси не допускають можливості інфікування середовища та просочування парів етанолу. Крім того,

					ПБ.БТ6201.ДП	Арк.
						112
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

підшипники змазуються рідиною, що перекачується, тому не забруднюються матеріалом для змазування. Проточну частину насоса виготовлено з нержавіючої сталі Х18Н10Т [98].

Вентилятори використовують в системах промислової вентиляції, пневмотранспортних та інших установках. За принципом дії вентилятори поділяють на вентилятори центробіжні та осьові. При виборі виду вентилятора виходять із заданих величин тиску, продуктивності, концентрації в повітрі механічних домішок, температури газів тощо.

Для дільниці біосинтезу було обрано приливний та витяжний вентилятори типу В-Ц14-46-5К-02 з двигуном АО2-71-4, який має продуктивність 5,55 м³/с. Вентилятор має бути виготовлений з матеріалів, призначених для переміщення повітря (вологість до 60%) як середовища, що не викликає корозію [99].

На підприємствах мікробіологічної промисловості 80-90% води йде на охолодження технологічного обладнання. Для охолодження апаратури проектується систему зворотного водопостачання. Охолодження відпрацьованої, теплої, умовно чистої води відбувається у градирнях за рахунок часткового випарювання під час контакту зі струмом повітря [100].

5.4. Вимоги до охорони праці та навколишнього середовища

У виробництві бета каротину використовуються рухомі механічні пристрої, які приводяться в рух за допомогою електричної енергії, а також відбуваються процеси, що супроводжуються значним виділенням теплової енергії. Даний проект передбачає використання внутрішньоцехового транспорту – трубопроводів, ручних візків, тари проміжного продукту. На стадії очистки та виділення продукту використовуються речовини небезпечні для здоров'я людини, пожежовибухонебезпечні речовини та матеріали.

					ПБ.БТ6201.ДП	Арк.
						113
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

Проект виконується з урахуванням вимог охорони праці, пожежобезпеки та екологічної безпеки.

В даному пункті на основі аналізу шкідливих та небезпечних виробничих факторів передбачено заходи і засоби щодо створення на даному підприємстві безпечних умов праці та пожежної безпеки.

Виробництво є нестерильним, оскільки як готовий продукт отримано біологічно активну добавку, а не готовий лікарський засіб. На даному виробництві знаходяться в обігу шкідливі, вибухо- та пожежонебезпечні речовини й матеріали, а також апарати, що працюють при підвищеному, під вакуумом та атмосферному тиску.

Основні причини забруднення повітря виробничої зони – недостатня герметичність апаратури, наявність ручних операцій, низька ефективність вентиляційних пристроїв тощо. При недостатній теплоізоляції обладнання та комунікацій можливий негативний вплив надлишкової теплоти.

На даному виробництві використовуються наступні шкідливі, вибухо- чи пожежонебезпечні речовини:

- Етилацетат – органічний розчинник, що використовується на етапі екстракції каротину. Це горюча речовина із температурою спалаху 2°C. Для гасіння використовується піна чи тонкорозпилювана вода. Пари етилацетату подразнюють слизові оболонки очей та дихальних шляхів, при дії на шкіру викликають дерматити та екземи. ГДК у повітрі робочої зони – 200 мг/м³ [101].

- Етанол – одноатомний спирт, змішується в будь-яких пропорціях з водою, етерами, ацетоном, бенzenом. Це високотоксична сполука, що нагріванні розкладається з утворенням фосгену. Пари етанолу при вдиханні виявляють токсичну дію на центральну нервову систему та слизові оболонки, викликаючи запаморочення, головний біль, втому. ГДК у повітрі робочої зони - 20 мг/м³ [101].

Профілактичні заходи у даному виробництві повинні бути направлені у першу чергу на боротьбу з виділенням у повітря робочої зони шкідливих речовин. Тому варто передбачити автоматизацію та механізацію технологічних процесів, ефективну роботу загальної та місцевої вентиляції, дотримання технологічного режиму.

Особливу увагу варто приділити герметизації обладнання і комунікацій, механізації процесів та операцій по завантаженню, розвантаженню та транспортуванню сировини, напівфабрикатів та готової продукції. Ступінь герметичності апаратів, а також методи і способи їх дослідження на герметичність, слід визначати по ГОСТ 26-11-14-88 [58].

Вали перемішуючих пристроїв апаратів, що вміщують вибухонебезпечні і шкідливі речовини, віднесені до 1-ого, 2-ого і 3-ого класів небезпеки по ГОСТ 12.1.007, повинні мати подвійні торцеві ущільнювачі або ущільнювачі інших типів, які забезпечують рівноцінну герметичність[102].

Апарати повинні бути забезпечені штуцерами для їх промивання і продування, для установки запобіжних пристроїв, контрольно- вимірювальних приладів і арматури. У необхідних випадках для проведення гідравлічних і пневматичних випробувань (як у вертикальному, так і в горизонтальному положенні) повинні бути передбачені штуцери для заповнення корпусу апарату і сорочки водою, випуску залишків повітря з верхньої частини корпусу апарату, а також отвір з пробкою і заглушкою для повного зливу води після випробувань[103].

Екологічні проблеми виробництва каротину визначаються у першу чергу використанням великих мас технологічної води та повітря та перетворенням їх на викиди. Небезпека цих викидів полягає і в наявності у них живих чи мертвих клітин мікроорганізмів, потрапляння яких у навколишнє середовище потенційно може викликати у ньому небажані зміни.

Особливу увагу на даному виробництві варто звернути на знешкодження розчинника етилацетату, який використовується у великих кількостях на етапі екстрагування бета каротину з культуральної рідини. Знешкодження парів етилацетату, отриманих на етапі випарювання екстракту, проводиться після їх попередньої конденсації. Відпрацьований етилацетат подається у реактор-змішувач із надходженням розчину лугу. При цьому легко відбувається гідроліз сполуки до етанолу та оцтової кислоти, які подаються на загальну очистку стічних вод. Можливий також варіант відновлення етилацетату. Для цього всі

відходи, що містять залишки етилацетату збирають у реактор, де вони

ук.

110.010201.011

15

інтенсивно перемішуються, а потім відстоюються. Після цього збирають легку фазу, відфільтровують її і перегоняють над P_2O_5 для видалення вологи. Отриманий етилацетат вертають у виробництво.

					ПБ.БТ6201.ДП	Арк.
						116
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

ВИСНОВКИ

1. В проєкті для виробництва харчового стабілізаційно профілактичного продукту Вітаміну А обрано продуцент *Blakeslea trispora* K2 із біосинтетичною активністю 2000 мг/л культуральної рідини.

2. Проаналізовано методи селекції промислових штамів-продуцентів каротинів та запропоновано схему отримання продуценту шляхом трьоступінчастої послідовної обробки мутагенами у встановлених ефективних дозах: тіосульфату натрію (20 г/л), нітрозогуанідином (1 мг/мл) і твін-80 (1мл/л), протягом 4 днів.

3. Враховуючи фізіолого-біохімічні особливості продуценту *Blakeslea trispora* K2 обрано склад поживного середовища для виробничого біосинтезу на основі кукурузного екстракту, соєвого борошна, рослинної олії, а також визначені раціональні параметри культивування: температура $28 \pm 1^\circ\text{C}$, перемішування при 200 об/хв, тривалість 72 год, аерація $1 V_{\text{пов}}/V_{\text{ПС}} \times \text{хв}$.

4. Відповідно до визначених фізико-хімічних та біологічних характеристик продукту для його біосинтезу обрана і розрахована конструкція виробничого ферментеру, яка дозволяє отримати препарат належної якості (концентрація каротину 2000 од/г, вміст СР 95%) з залишковою вологістю 5%.

5. Запропоновано використання етанолу в якості екстрагента вітамінного препарату, що обумовлює підвищення швидкості та якості його вилучення, а також найбільшу концентрацію продукту в культуральній рідині.

6. У відповідності до вимог до готової форми та якості продукту, розроблено технологічну і апаратурну схеми виробництва вітаміну А (бета-каротину) для харчової промисловості в банках по 1 кг.

					ПБ.БТ6201.ДП	Л/Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		